UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

Année 1972-1973

Série E. n° 273

THESE

Présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES
DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

par

Jacques-Christian DARBORD

RECHERCHES SUR LE MÉCANISME D'ACTION DE LA GRISÉOFULVINE PAR L'ÉTUDE DE MUTANTS RÉSISTANTS CHEZ Arthroderma simii

Soutenue le : 21 Juin 1973

JURY : Monsieur A. DESVIGNES — Président
Monsieur J. BORY
Monsieur H. NGUYEN VAN
Monsieur F. MARIAT
— Examinateurs

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

Année 1972-1973

Série E. n° 273

THESE

Présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES
DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

par

Jacques-Christian DARBORD

RECHERCHES SUR LE MÉCANISME D'ACTION DE LA GRISÉOFULVINE PAR L'ÉTUDE DE MUTANTS RÉSISTANTS CHEZ Arthroderma simii

Soutenue le : 21 Juin 1973

JURY : Monsieur A. DESVIGNES — Président
Monsieur J. BORY
Monsieur H. NGUYEN VAN
Monsieur F. MARIAT
— Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Monsieur le Professeur A.DESVIGNES,

Professeur de Microbiologie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université René Descartes,

qui nous a accueilli avec la plus grande bienveillance dans son laboratoire et à qui nous devons aujourd'hui la réalisation de cette thèse dont il a accepté de présider le Jury.

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J.BORY,

Professeur de Microbiologie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université René Descartes,

qui nous a dispensé son enseignement et qui nous a fait l'honneur de juger ce travail.

En témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur H.NGUYEN VAN,

Pharmacien, Docteur ès Sciences Naturelles,

qui a eu l'obligeance de diriger notre thèse et nous a fait bénéficier de sa rigueur scientifique et de sa grande expérience pour la recherche en génétique.

Avec l'expression de notre vive gratitude et de notre amitié.

A Monsieur le Professeur F.MARIAT,

Chef du département de Biologie fongique du laboratoire de Mycologie à l'Institut Pasteur de Paris,

qui après s'être intéressé à ce travail a accepté de le juger.

Avec l'expression de nos sincères remerciements.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544720_0006

A mes Parents

A ma Femme

A mes deux filles, Laurence et Isabelle

A mes Amis et tous les miens

A Madame S.CHARONNAT, Pharmacien-Chef à l'Hôpital Intercommunal de Créteil. Qu'elle soit assurée de la respectueuse gratitude d'un ancien interne.

A Mademoiselle le Professeur S.LAMBIN, qui m'a conseillé et orienté vers la génétique. En témoignage de notre profond respect.

A Monsieur Dominique VIDON, en souvenir d'un fructueux travail d'équipe, avec nos remerciements les plus sincères et toute notre amitié.

A Monsieur Jean-Loup GOULAY, en remerciement de l'aide qu'il nous a apportée pour la réalisation des photographies.

A tous les membres des Laboratoires de Microbiologie et de Cryptogamie de la Faculté, tout particulièrement Madame T.UNBEKANDT qui nous a apporté une aide amicale et efficace.

S O M M A I R E

INTRODUCTION 3

TRAVAUX PERSONNELS 13

PREMIERE PARTIE

Etude génétique de la résistance à la griséofulvine

Chapitre I - Obtention de mutants résistants à la griséofulvine 16

1) Etude de l'inhibition de la germination des microconidies par la griséofulvine 18

2) Recherche de mutants spontanés 22

3) Recherche de mutants induits 22

Chapitre II - Analyse génétique des mutants résistants à la griséofulvine 25

1) Techniques 26

2) Résultats 28

3) Conclusions 40

DEUXIEME PARTIE

Etude du mécanisme de l'action fongistatique de la griséofulvine chez Arthroderma simii et recherche du mécanisme de la résistance

Chapitre I - Etude et modifications du pouvoir fongistatique de la griséofulvine 42

Chapitre II - Etude des modifications macroscopiques de la morphologie des cultures sous l'influence de la griséofulvine 50

Chapitre III - Etude microscopique des modifications des caractéristiques morphologiques et cytologiques des cultures 57

Chapitre IV - Comparaison de l'incorporation de la griséofulvine par les mycéliums sensible et résistant 71

Chapitre V - Variation de la teneur de quelques composants cellulaires.Modifications de la structure chimique de la griséofulvine 92

1) Dosage des acides nucléiques 93

2) Dosage des lipides totaux 98

3) Modifications chimiques de la griséofulvine. Mise en évidence par chromatographie sur papier 100

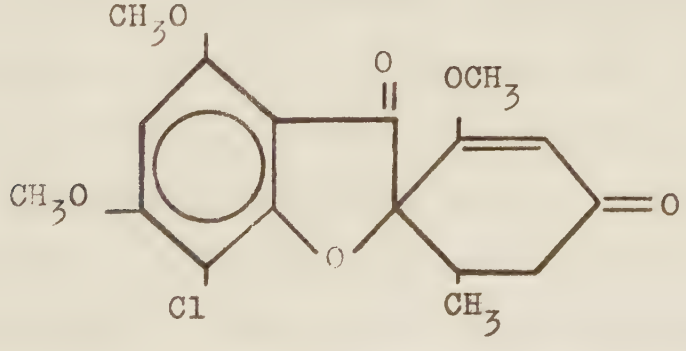
Chapitre VI - Comportement des souches résistantes à la griséofulvine vis à vis d'autres antifongiques 104

CONCLUSIONS 110

BIBLIOGRAPHIE I à XIII

La griséofulvine ($C_{17}H_{17}O_6Cl$) a été isolée d'un milieu de culture de Penicillium griseofulvum dès 1939 (70) , mais ce n'est qu'en 1949 qu'une activité biologique lui a été reconnue (20) . Les premiers auteurs décrivirent cette substance sous le nom de "curling factor" (19) . Elle est capable en effet de provoquer chez certains champignons des cultures très altérées , présentant une croissance ralentie et des hyphes recourbées (5,6,17,66). D'autres Penicillium sont capables de produire de la griséofulvine , en particulier P.janczewskii , P.patulum , et P.raistrickii (21) .

En 1952 , la structure de la griséofulvine fut établie par GROVE , MACMILLAN , MULHOLLAND et ROGERS (47).



Griséofulvine.

Le spectre d'action de la griséofulvine n'est pas très étendu parmi les microorganismes . Elle n'inhibe pas la croissance des bactéries , ni celle des champignons lévuriformes . Seul un certain nombre de champignons voient leur croissance inhibée ou réduite , et parmi eux les dermatophytes (37,45,74,80,81,86) . Les doses inhibitrices sont variables , elles dépendent des conditions de culture et de l'espèce . Certains dermatophytes ont en effet une résistance plus élevée que d'autres (2 à 40 mcg/ml de griséofulvine présents dans le milieu provoquent une inhibition de la germination ou de la croissance des cultures selon l'espèce considérée) .

Quelques champignons modérément sensibles , parasites des plantes (Botrytis alii , Botrytis cinerea), ont souvent servi de matériel pour l'étude du mécanisme d'action de la griséofulvine (20,51).

De très nombreuses observations cytologiques ont été faites , indépendamment de l'étude de l'action fongistatique . En effet la griséofulvine est un antimitotique caractéristique du type colchicine . Ces études cytologiques fondamentales ont montré l'arrêt de la mitose en métaphase , et ceci sur des cellules de toute origine . PAGET et ses collaborateurs (71,72,73) découvrirent ce phénomène sur les cellules de divers

organes du rat . DEYSSON (27,28,29) a utilisé des cellules végétales (Allium) et humaines (HeLa) . MALAWISTA (64) a montré que l'action de la griséofulvine est réversible et plus rapide que celle d'autres antimitotiques connus (colchicine , vinca) . Il a utilisé des oocytes de Pectinaria (anélide) présentant la propriété d'avoir une très longue métaphase , ce qui lui a permis d'observer une dissolution complète et réversible du fuseau métaphasique sous l'action de la griséofulvine . D'autres travaux (23,69) ont également été consacrés à l'étude de ce phénomène . Dernièrement l'action antimitotique de la griséofulvine a été retrouvée chez un champignon très peu sensible , Aspergillus nidulans (22). Enfin , THYAGARAJAN , SRIVASTAVA et VORA (93) ont étudié l'action de la griséofulvine sur les noyaux de plusieurs dermatophytes (Trichophyton mentagrophytes , Trichophyton rubrum , Microsporum canis , Microsporum gypseum , Epidermophyton floccosum) . Lorsque la culture était faite directement en présence de 1 mcg/ml de griséofulvine , ou encore après addition de 20 mcg/ml de griséofulvine à des cultures de 72 heures , ces auteurs ont noté la présence dans les hyphes en croissance active de noyaux plus nombreux , de taille et de forme variées . L'étude a été faite comparativement à des cellules témoins ayant cultivé sur milieu simple . Dans ces

conditions les noyaux au repos étaient ovales ou ronds , réguliers et en moins grand nombre , la division nucléaire se faisant par simple élongation et constriction . Dans les parties anciennes il n'y avait aucune modification . Ces auteurs n'ont publié aucune photo ni donnée numérique.

Nous pouvons remarquer que si ces travaux démontrent une action indiscutable de la griséofulvine sur la mitose et plus particulièrement sur le fuseau métaphasique, cette action se retrouve chez tous les types de cellules étudiées et ne saurait , à elle seule , expliquer le mécanisme d'action de la griséofulvine sur les souches qui lui sont particulièrement sensibles , d'une façon tout de même très spécifique . La comparaison entre le spectre d'activité peu étendu de la griséofulvine et son pouvoir antimitotique très général nous oblige à séparer l'action fongistatique de ce pouvoir antimitotique . Cette phase antimitotique est peut-être la phase finale , la spécificité d'action pouvant être due , soit à un caractère particulier du métabolisme du champignon sensible , soit à une caractéristique physique ou chimique de ses constituants (composition de la paroi , structure de la membrane nucléaire , mécanisme particulier pour la division nucléaire , etc....). Notons également pour compléter le rapprochement avec la colchicine , que la

griséofulvine a une action antirhumatismale très nette (89).

En 1958 , la griséofulvine fut introduite en thérapeutique humaine , seul se manifestant son pouvoir antifongique (42,84).

Divers auteurs ont publié depuis 15 ans d'intéressantes revues concernant des travaux antérieurs effectués sur cet antibiotique (10,18,37,46,50,51) , et de nombreuses publications fournissent des arguments en faveur de plusieurs interprétations , différentes les unes des autres, du mécanisme d'action de la griséofulvine , mécanisme qui semble donc loin d'être bien connu .

Les premières théories émises mettaient en cause la constitution de la paroi . BRIAN (18) , en effet , a établi un parallèle entre la présence de chitine et la sensibilité des champignons à la griséofulvine . Plus tard, une étude microcinématographique de la croissance et de la germination des spores de Microsporum gypseum en présence de griséofulvine a été faite par de BEER et PRUNIERAS (24,78) : des projections en accéléré de photographies prises à intervalles réguliers ont permis d'observer des déformations cellulaires et des courants cytoplasmiques irréguliers que ces auteurs ont associé à une altération de la synthèse de la paroi . Des études au microscope électronique (13,39,77) ont mis en évidence

des modifications physiques de la paroi qui s'épaissit en présence de l'antibiotique . D'autres arguments en faveur de la théorie de BRIAN peuvent être donnés . Il a été prouvé en effet que la griséofulvine avait une action très intense et très caractéristique chez certains insectes . ANDERSON (2) a montré , sur des moustiques , que la toxicité de la griséofulvine se traduisait par de grands décollements de la cuticule chitineuse et que , par contre , il n'y avait aucune altération des autres organes , en particulier des muscles . Remarquons en revanche que si la constatation de BRIAN est exacte dans la plupart des cas , il existe des exceptions: Aspergillus niger est très riche en chitine mais il est très peu sensible à la griséofulvine (1,62) . De plus HUBER et GOTTLIEB (51) n'ont pas trouvé chez Botrytis cinerea d'accumulation d'antibiotique dans la paroi , ni de variation du taux de chitine chez ce champignon . EVELEIGH et KNIGHT ont d'ailleurs dosé les différents constituants de la paroi (40),sans trouver de différence analytique , après incubation de mycéliums en présence ou en absence d'antibiotique .

Les études physiologiques et physico-chimiques ont été nombreuses mais également dispersées , et ont

souvent donné des résultats très contradictoires . Notons tout d'abord que la griséofulvine n'a aucun effet sur la respiration cellulaire et sur la glycolyse (20,51,56,75,85). Les principaux constituants cellulaires ont été analysés chimiquement , soit directement par les techniques analytiques classiques , soit indirectement par l'évaluation de l'incorporation de précurseurs radioactifs (37,40,51). La composition chimique reste stable pour la plupart des constituants , en présence de griséofulvine . En particulier il n'y a pas de diminution de la synthèse protéique, si l'on considère les résultats rapportés au poids sec . La seule différence signalée est l'augmentation sensible de la teneur en ADN (40,51) .

La variation de la concentration de l'antibiotique dans les mycéliums a également été étudiée pour chercher à comprendre les conditions de l'action de la griséofulvine. Les champignons sensibles à cet antifongique possèderaient en effet la propriété de prélever la griséofulvine et de la concentrer dans leurs constituants , aux dépens du milieu de culture . EL NAKEEB et LAMPEN ont réalisé cette étude sur Microsporum gypseum en utilisant de la 4-méthoxy ^{3}H griséofulvine . Le champignon a été mis à incuber pendant des temps variés , en présence de 10 mcg/ml de griséofulvine marquée , puis la radioactivité a été

recherchée et mesurée dans le mycélium et le filtrat . Le champignon pourrait concentrer la griséofulvine jusqu'à 100 fois par rapport au milieu de culture . Le prélèvement se ferait selon ces auteurs en deux étapes (34,36) :

1) Une faible partie de la radioactivité serait captée presque instantanément , indépendamment des conditions de culture et de la viabilité de la cellule . Cette fraction est extractible par l'eau chaude à 80°C .

2) La deuxième phase , plus longue , serait gouvernée par différents facteurs : pH , température , oxygène , source d'énergie , inhibiteurs de la respiration (azide de sodium et 2,4 dinitrophénol) , ou encore inhibiteurs des synthèses enzymatiques .

Les mêmes auteurs ont également étudié la répartition de la griséofulvine dans différentes fractions cellulaires (33,35,36) . Au bout de 96 heures d'incubation, ils ont mis en évidence 43% de la radioactivité dans une fraction facilement extractible par de l'eau chaude , 27% fixée sur les acides nucléiques et 27% fixée sur les protéines . D'autre part (32,33) , in vitro et à 4°C ,

des ribosomes de Microsporum gypseum seraient capables de fixer d'une manière très forte la griséofulvine , alors que la même expérience est négative en partant de ribosomes appartenant à une autre espèce insensible à cet antifongique . La réserve essentielle que nous pouvons faire sur cette expérience concerne la température d'incubation de 4°C qui rend difficile le rapprochement avec ce qui se passerait chez un champignon vivant .

HUBER et GOTTLIEB (51) ont réalisé des expériences similaires sur la distribution de la griséofulvine dans différentes fractions cellulaires , en utilisant un marquage radioactif par le ^{14}C et comme matériel biologique Botrytis cinerea . Cette souche est beaucoup moins sensible que les dermatophytes . A la concentration de 20 mcg/ml , la griséofulvine provoque chez ce champignon la formation d'hyphes désorganisées , rabougries ainsi que les torsades caractéristiques . Par contre il n'y a pas d'inhibition de la germination des spores . Ces auteurs ont trouvé 47% de la griséofulvine dans une fraction lipidiqueet 28% dans deux fractions non identifiées extractibles par l'éthanol et l'acide trichloracétique à froid . Il y aurait également 15% de

la griséofulvine totale fixée sur les acides nucléiques , 5% sur les protéines et 5% dans les résidus (chitine et autres constituants de la paroi) .

T R A V A U X P E R S O N N E L S

Au cours de l'exposé précédent , nous nous sommes efforcés de faire le point sur les différents modes d'action invoqués pour expliquer l'activité antifongique de la griséofulvine .

Cependant , dans la plupart des cas , il nous a été impossible de relier entre eux les nombreux résultats d'une manière logique : action antimitotique , action sur la paroi chitineuse , action sur la synthèse de l'ADN , fixation sur l'ARN , sur les lipides , les protéines .

C'est pourquoi , les expériences ayant été effectuées sur des souches différentes et dans des

conditions très diverses , il nous a semblé intéressant de reprendre une partie des travaux précédemment exposés concernant le mécanisme d'action de la griséofulvine chez les dermatophytes , en travaillant sur une même espèce , Arthroderma simii (91) , en recherchant des mutants résistants stables et en les comparant à la souche sauvage sensible d'origine .

Nous avons choisi Arthroderma simii* comme matériel de travail , ce champignon étant particulièrement favorable, parmi les dermatophytes, à ce type d'étude . Il nous fallait en effet pouvoir effectuer une étude génétique , c'est à dire obtenir des mutants et analyser ces mutants : Arthroderma simii possède un nombre particulièrement élevé d'aleuries ou microconidies , uninuclées (95) , ce qui permet de préparer des suspensions unicellulaires homogènes , riches et dénombrables , ce fait facilitant considérablement la sélection de mutants . De plus , la reproduction sexuée de cette espèce hétérothallique est assez facile à obtenir .

---

* Les souches nous ont été fournies par Miss STOCKDALE que nous remercions vivement : Arthroderma simii (+) , n° CMI 101.693 ; Arthroderma simii (-), n°CMI 101.695.

Ce travail a comporté deux parties bien distinctes :

- d'une part , la recherche de mutants d'Arthroderma simii résistants à la griséofulvine et l'étude génétique de ces mutants .

- d'autre part , la comparaison des différentes caractéristiques des mutants obtenus avec celles de la souche sauvage sensible .

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I - Obtention de mutants résistants à la griséofulvine

Depuis la découverte et surtout l'utilisation thérapeutique de la griséofulvine , de nombreux auteurs ont été intéressés par l'apparition de la résistance à cet antifongique sur le plan clinique (6,7,43,54,76,92) , ou par la recherche *in vitro* de mutants résistants (5,18,38,44,53,59,60,61,82,83,94) .

En fait la quasi totalité de ces recherches n'a démontré que la possibilité d'une adaptation de certaines souches de dermatophytes cultivées en présence de griséofulvine .

La méthode employée dans la plupart des cas consiste à mettre en présence le champignon avec des

doses croissantes d'antibiotique (résistance "multiple steps") . Le champignon acquiert une résistance à des doses faibles d'antibiotique , et perd cette résistance après passage sur milieu non sélectif . Seul LENHART a annoncé , dans une brève communication (60) , l'obtention de mutants résistants , à partir d'une souche sensible de Microsporum gypseum . La mutation était spontanée . Ces mutants sont stables . Ils possèdent les mêmes caractères culturaux que le type sauvage , leur aspect microscopique ainsi que leurs exigences nutritionnelles sont identiques . LENHART a fait l'analyse génétique de croisements entre quelques uns de ces mutants résistants et une souche sauvage , sensible , marquée génétiquement par un caractère morphologique . Il a ainsi obtenu 50% de phénotypes résistants et 50% de phénotypes sensibles dans la descendance et a pu affirmer que ce caractère était toujours contrôlé par un seul gène . Par contre la liaison génétique du gène responsable de la résistance avec le marqueur morphologique dans l'un des croisements n'a pas démontré clairement , à notre avis , l'existence de plusieurs loci . Seule l'apparition de souches sensibles , recombinées , dans la descendance de parents résistants , simples mutants , permettrait indiscutablement de conclure à l'existence de plusieurs loci

responsables de la résistance .

La recherche de mutants doit se faire à partir d'une préparation homogène et riche en éléments unicellulaires et uninucléés , condition qui est réalisée par une suspension d'aleuries ou microconidies . Il a tout d'abord été nécessaire de déterminer la sensibilité de ces spores à la griséofulvine , en évaluant leur pourcentage de germination en fonction de la concentration en antifongique des milieux de culture . Nous avons ensuite recherché des mutants résistants en nous plaçant dans une zone d'inhibition totale de la germination .

1) Etude de l'inhibition de la germination des microconidies par la griséofulvine

Des suspensions de microconidies , obtenues en ajoutant 5 ml d'eau permutée stérile à des cultures sur milieu solide de 15 à 20 jours , ont été débarrassées des filaments , macroconidies et différents débris par filtration sur disque de verre fritté Sovirel de porosité n°3 . Nous avons déterminé la richesse de ces suspensions par numération dans une cellule de type hématimètre de Malassez (en général 5 à 10 millions de

microconidies par ml). Des dilutions convenables de ces suspensions nous ont permis d'obtenir , après culture sur milieu solide , des colonies isolées et aisément repérables , toutes issues de la même spore uninuclée . Il est possible de dénombrer jusqu'à 200 colonies environ par boîte de Petri .

Le milieu de culture utilisé était le milieu MM_{10} (26) , dont la composition est la suivante :

- Maltea Moser	10 g
- gélose	15 g
- actidione	100 mg
- sulfate de gentamycine	100 mg
- eau	1000 ml

pH 5,6

La griséofulvine à ajouter a été dissoute dans de la diméthylformamide à une dilution telle que la quantité totale de solvant dans le milieu de culture final soit de 1% , car à des doses plus élevées la diméthylformamide inhibe en partie la germination . De plus , le solvant diminue nettement la taille des colonies dès qu'il atteint la concentration de 5% (3) .

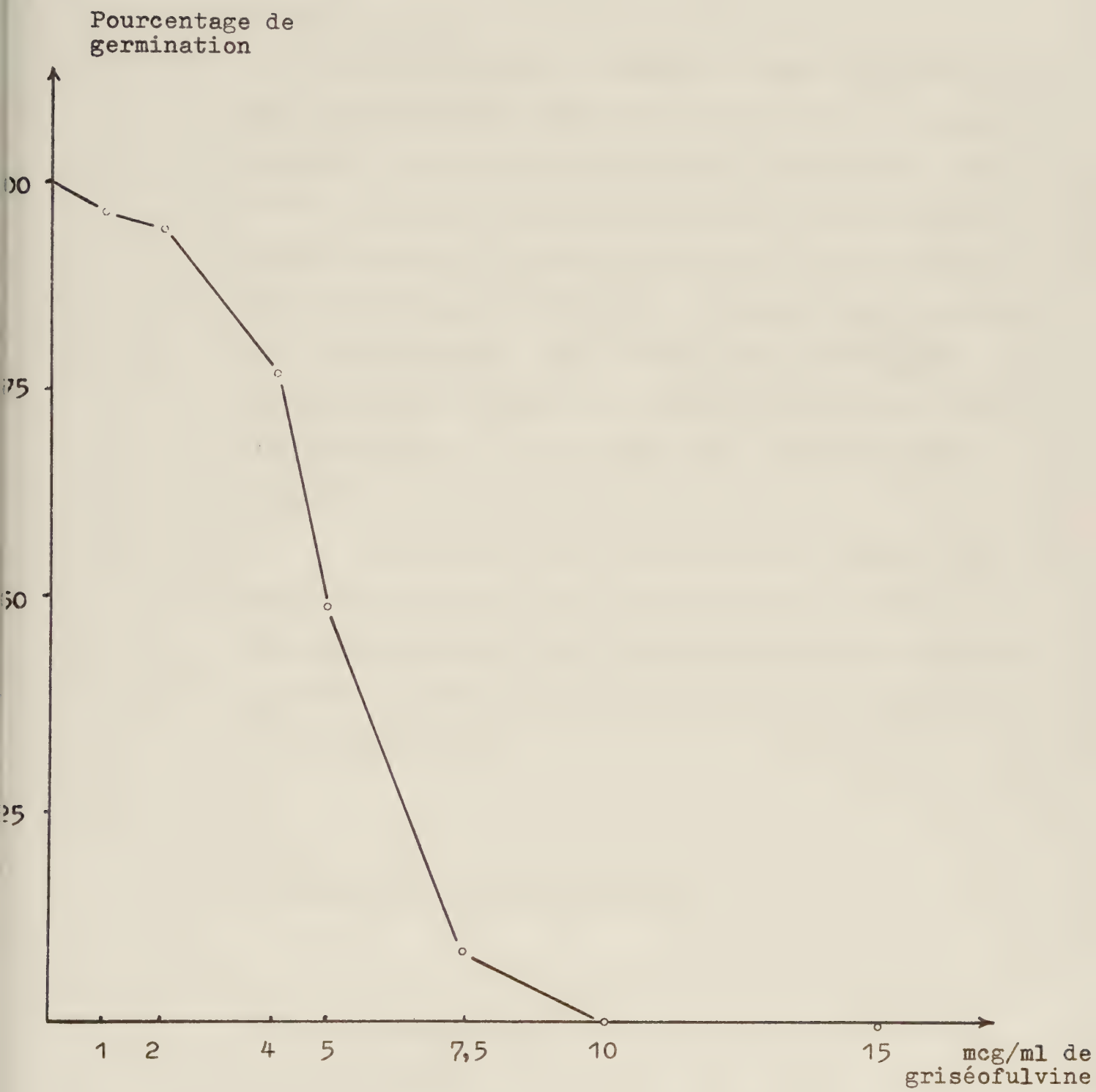
Il nous a fallu adapter la richesse des suspensions de microconidies utilisées aux différentes

concentrations de griséofulvine . En effet , si quelques centaines de spores ont suffi pour les faibles concentrations en antifongique , l'observation de plusieurs millions de microconidies a été nécessaire à l'évaluation du pourcentage de germination en présence de 10 ou 15 mcg/ml de griséofulvine . Ces résultats sont résumés dans le tableau n°1 et par la courbe n°1 .

Tableau n°1. Variation du pourcentage de germination des microconidies sur un milieu solide , en fonction de la concentration en griséofulvine.

Concentration en griséofulvine(mcg/ml)	1	2	4	5	7,5	10	15
Pourcentage de germination	97	95	78	52	9	001	0

Remarquons que ces résultats ne rendent compte de l'inhibition de la culture par la griséofulvine que dans des conditions bien particulières . Il s'agit ici de la variation du pourcentage de germination de microconidies , en fonction de la concentration en griséofulvine présente dans un milieu nutritif solide .



Courbe n°1. Variation du pourcentage de germination des microconidies d'Arthroderma simii sur un milieu solide, en fonction de la concentration en griséofulvine.

2) Recherche de mutants spontanés

Nous avons vu , dans le paragraphe précédent , que sur milieu MM_{10} additionné de 10 mcg/ml de griséofulvine , nous avons obtenu environ une colonie pour 10 000 microconidies étalées . Nous en avons étudié un certain nombre : toutes ces colonies , après passage sur milieu MM_{10} non sélectif , perdaient leur résistance à la griséofulvine . Nous avions donc affaire à de simples souches adaptées , incapables de transmettre à leur descendance , même végétative , leur phénotype résistant .

Sur milieu MM_{10} additionné de 15 mcg/ml de griséofulvine nous n'avons obtenu aucune culture , même après étalement de plusieurs dizaines de millions de spores , nombre compatible avec un taux de mutation de l'ordre de 10^{-8} .

3) Recherche de mutants induits

Il nous a alors paru nécessaire dans ces conditions de rechercher l'obtention de mutants induits . Nous avons écarté la mutagénèse aux rayons ultra-violets

qui , malgré sa facilité d'emploi,ne semble pas donner d'excellents résultats sur les dermatophytes (58,60) et peut provoquer des désordres génétiques difficilement interprétables par la suite (délétion importante par exemple) .

Nous avons utilisé l'action de la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) , à la dose de 800 mcg/ml pendant 1 heure et à l'obscurité . Le pourcentage de spores survivantes était dans ces conditions d'environ 2%. Après contact avec l'agent mutagène , les microconidies ont été lavées 3 fois à l'eau permutée stérile , et la suspension finale étalée directement sans dilution en boîte de Petri sur milieu MM_{10} additionné de 15 mcg/ml de griséofulvine .

Au cours de cette première recherche de mutants, le nombre de microconidies étalées était de 80 millions , réparties en 40 boîtes de Petri . Dès le 11° jour , 29 colonies apparaissaient et elles étaient 392 après 16 jours de culture .

109 de ces colonies prises au hasard ont été ensemencées d'abord sur milieu simple MM_{10} non sélectif , puis après 6 jours de culture sur milieu MM_{10} contenant 15 mcg/ml de griséofulvine . 54 colonies sur 109 n'avaient pas perdu leur caractère résistant et ont été une nouvelle

fois remises en culture sur milieu non sélectif , ce passage sur milieu MM_{10} étant ainsi recommencé 3 fois . Au terme de cet essai , les 54 résistants ont été considérés comme mutants stables .

Le taux de mutation est égal à $2,5\ 10^{-6}$. En tenant compte du pourcentage de survivants après l'action de la nitrosoguanidine , qui n'est que de 2% , nous pouvons constater un taux de mutation réel de l'ordre de $1,25\ 10^{-4}$, taux très élevé .

CHAPITRE II - Analyse génétique des mutants résistants à la griséofulvine

L'analyse génétique du caractère "résistance à la griséofulvine" des mutants en notre possession fut essentielle à la poursuite de notre travail . L'interprétation des expériences définies précédemment serait beaucoup plus facile si l'on pouvait connaître par avance le nombre de caractéristiques phénotypiques différentes existant entre la souche sauvage et les souches résistantes . Ce nombre serait d'autant plus petit que celui des gènes en cause serait faible . Ces gènes pourraient soit avoir pour produit une protéine responsable directement de la sensibilité ou de la résistance, soit agir indirectement , la protéine ayant alors une activité enzymatique permettant la synthèse d'un autre produit , qui ne serait plus nécessairement de nature protéique . Dans les deux cas , il serait théoriquement possible de prouver l'existence chez la souche sauvage ,

d'une substance qu'une mutation modifierait (mutation faux sens) , ou même supprimerait (délétion et mutation non sens) , établissant ainsi le phénotype résistant (41).

LENHART (60) a réalisé une étude des mutants résistants précédemment cités (Microsporum gypseum) . Tous les mutants qu'il a étudiés étaient de simples mutants , mais correspondant peut-être à plusieurs loci différents . Nous nous sommes limités personnellement à l'analyse complète de quelques mutants , et dans la suite du travail , nous avons utilisé exclusivement ces souches de génotype bien précisé .

1) Techniques

La première difficulté rencontrée fut l'obtention de la reproduction sexuée . Nous avons utilisé le milieu au flocon d'avoine gélosé dont la formule est la suivante :

- Quaker oats	10 g
- $MgSO_4,7H_2O$	1 g
- KH_2PO_4	1 g
- $NaNO_3$	1 g
- gélose	15 g
- eau	1000 ml

pH 5,6

En juxtaposant thalle contre thalle une souche résistante de signe (+) et la souche sauvage de signe d'incompatibilité opposé , nous n'avons obtenu des cléistothèces que dans trois croisements seulement avec les souches mutantes n° 4 , 7 et 21 .

Pour améliorer ces résultats , nous avons dû employer la technique du "croisement standard" : deux suspensions de microconidies étaient préparées dans de l'eau permutée stérile , à partir de chacune des souches à confronter . Le mutant résistant ayant en général une croissance plus lente que la souche sauvage sur milieu non sélectif , la suspension de microconidies sauvages était diluée au 1/10 afin d'équilibrer l'importance des deux cultures . Puis , successivement , une goutte de chaque suspension était déposée au centre d'une boîte de Petri contenant le milieu au flocon d'avoine , et la culture mise à incuber à 25°C pendant 15 jours . Dans ces conditions , les croisements de la plupart des mutants en notre possession et de la souche sauvage ont été fertiles .

Pour l'analyse génétique proprement dite , nous avons le choix entre plusieurs techniques , que nous avons d'ailleurs toutes utilisées . Arthroderma simii est un

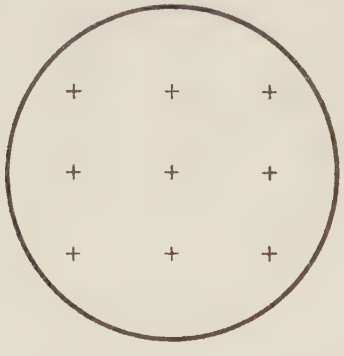
champignon ascomycète . La reproduction sexuée conduit à la formation de fructifications appelées cléistothèces , qui contiennent de très nombreux asques arrondis de 5 à 8 microns de diamètre . Ces asques renferment 8 ascospores uninucléées, ovales de 2x3 microns . Il est possible, soit de faire une analyse en masse en libérant un grand nombre de ces ascospores et en étudiant statistiquement la répartition de leur phénotype , soit de réaliser asque par asque et au micromanipulateur une étude des 4 produits d'une même méiose (25,26,27) .

2) Résultats

Dans la plupart des cas , nous avons préparé des suspensions d'ascospores , en crevant dans un tube à hémolyse contenant 2 ml d'eau permutée stérile un ou plusieurs cléistothèces , prélevés avec une aiguille fine sous la loupe binoculaire .

Cette suspension , filtrée sur disque de verre fritté Sovirel de porosité n°3 pour éliminer les débris de la paroi du cléistothèce , puis diluée convenablement et étalée en boîtes de Petri , nous a permis d'obtenir des colonies isolées issues chacune d'une ascospore . Pour les premiers croisements analysés , nous avons

réalisé préalablement un premier étalement sur milieu MM_{10} pour ensemencer ensuite chaque colonie individuellement sur le même substrat . Nous avons ainsi disposé 9 semis par boîte de Petri selon le schéma suivant :



Après 5 à 8 jours de culture , chacune de ces boîtes a été répliquée au moyen d'un tampon de velours stérile , d'abord sur milieu MM_{10} contenant de la griséofulvine , puis immédiatement après sur une autre boîte de milieu MM_{10} non additionné d'antifongique . Au cinquième jour il était possible de repérer les colonies résistantes sur la première boîte , puis d'en déduire le nombre de colonies sensibles par différence avec les témoins obtenus sur le milieu non sélectif de la deuxième boîte . Cette technique a été employée pour les mutants 4,7 et 21 et nous avons obtenu les résultats consignés dans le tableau n°2 .

Tableau n°2. Analyse génétique de trois mutants par réplique.

Mutant n°	Total	Résistants	Sensibles	X^2
4	88	51	37	0,72
7	45	22	23	0,02
21	54	29	25	0,05

Nous avons calculé pour chaque croisement le paramètre X^2 de PEARSON , afin de vérifier si les fréquences de chacun des deux phénotypes obtenus , sensible et résistant , étaient conformes à l'hypothèse la plus simple représentée par l'implication d'un seul couple de gènes allèles .

Le paramètre X^2 peut être représenté par la fonction :

$$X^2 = \frac{(o_1-t_1)^2}{t_1} + \frac{(o_2-t_2)^2}{t_2} + \frac{(o_3-t_3)^2}{t_3} + \ldots\ldots\ldots$$

- o_1, o_2, o_3 .....étant les fréquences observées de chaque phénotype .

- $t_1, t_2, t_3 \ldots\ldots$ étant les fréquences théoriques correspondantes .

En prenant l'exemple du croisement n°4 , nous avons à considérer deux classes :

- le nombre total de colonies , soit 88.
- le nombre de colonies résistantes , soit 51.

(Le nombre de colonies sensibles étant obtenu à partir de ces deux classes , il n'intervient pas dans le calcul).

Les nombres théoriques seront donc :

- total des colonies : (88+51)x2/3=92
- colonies résistantes : (88+51)x1/3=46

Nous obtenons ainsi le X^2 :

$$X^2 = \frac{(88-92)^2}{92} + \frac{(51-46)^2}{46} = 0,72$$

Il reste à définir le nombre de degrés de liberté (ddl) qui est dans ce cas de 1 , chacune des deux classes pouvant être déduite l'une de l'autre en connaissant leur somme par simple différence .

En se rapportant à une table , nous pouvons admettre notre hypothèse ,avec un risque d'erreur de 5%, lorsque le X^2 est inférieur à 3,81 . Dans le cas du

croisement n°4 qui nous a servi d'exemple , le X^2 , égal à 0,72 , nous permet d'attribuer au hasard les différences relevées avec les fréquences théoriques .

Par la suite , nous avons employé une technique plus facile et plus rapide , qui permettait en outre l'examen du phénotype d'un nombre plus élevé d'ascospores. A partir de suspensions préparées comme précédemment , il a suffi de répartir exactement le même volume d'une même dilution dans deux séries de boîtes de Petri , qui contenaient respectivement du milieu MM_{10} et du milieu MM_{10} additionné de griséofulvine . Après 4 à 5 jours d'incubation à 25°C , la numération des colonies apparues sur chaque type de milieu nous a donné immédiatement le nombre de résistants , et par différence le nombre de sensibles .

Nous donnons dans le tableau suivant(n°3) quelques résultats obtenus . Le calcul du X^2 de conformité à l'hypothèse 50%:50% a été réalisé et possède la même limite que précédemment .

Dans tous les cas , l'épreuve de conformité X^2 nous a montré qu'il n'existait pas de différence significative entre nos fréquences observées et les fréquences théoriques 50%:50% . Remarquons tout de même que , dans la plupart des croisements étudiés , il y avait un léger

Tableau n°3. Analyse génétique de huit mutants résistants à la griséofulvine par étalements.

Mutant n°	Total	Résistants	Sensibles	X^2
9	319	150	169	0,39
3	609	305	304	0,05
19	460	242	218	0,41
11	549	292	257	0,73
2	113	57	56	0,01
1512	383	209	174	1,04
1532	257	122	135	0,22
15	300	131	169	1,06

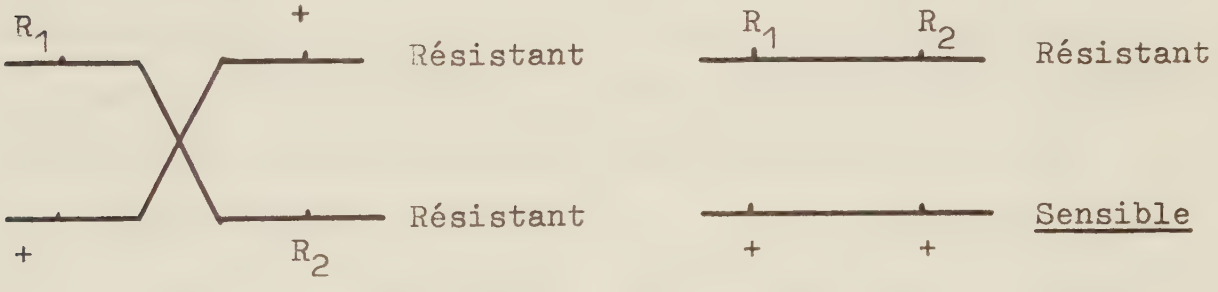
excès de phénotypes résistants par rapport aux phénotypes sensibles , ce phénomène pouvant s'expliquer en partie par l'adhérence que nous avons pu observer au microscope entre quelques très rares ascospores en groupes de deux ,parfois trois . Ceci n'a pas beaucoup diminué la sensibilité de la méthode . Néanmoins , il est apparu ainsi des colonies mixtes de phénotype résistant lorsque l'une des ascospores était résistante , faussant légèrement les pourcentages observés .

Afin de compléter ces résultats , nous avons réalisé , pour les croisements des mutants n°2 et 4 , une analyse de 11 asques au micromanipulateur de de Fonbrune (25) . Tous les asques étudiés présentaient une ségrégation dans le rapport 4:4 pour le couple de caractère résistant et sensible .

Nous avons donc démontré que le caractère résistant était transmis à la descendance , au cours de la reproduction sexuée selon le rapport 4:4 . Ce caractère est donc porté individuellement par un seul gène nucléaire. Il restait à rechercher si ces mutants étaient identiques, ou si plusieurs loci étaient concernés .

Pour réaliser cette étude , il fallait disposer d'une souche résistante monogénique de signe (-) et

croiser cette souche témoin avec les autres souches résistantes monogéniques de signe (+) . Si les deux souches mises en présence étaient de même génotype , aucune recombinaison ne pourrait intervenir et tous les descendants en F_1 garderaient le phénotype résistant . Par contre , si les deux loci étaient différents , des recombinaisons pourraient avoir lieu , provoquant l'apparition de descendants F_1 sensibles à la griséofulvine . La fréquence théorique maximum , pour des gènes indépendants , serait de 25% de phénotypes sensibles :



En réalisant cette expérience avec la même souche de référence , il a suffi d'un unique croisement pour chaque mutant . Il est bien évident que la sensibilité de la méthode dépend du nombre de descendants F_1 analysés . Deux loci très proches l'un de l'autre n'auraient pu être distingués que par une recherche portant sur de nombreuses ascospores . L'analyse de 100 ascospores , en ne supposant aucune erreur dans la

numération , devrait pouvoir différencier théoriquement 2 gènes distants de 2 unités de crossing-over (UCO) , puisque dans ce cas il y aurait apparition d'une seule colonie sensible . Rappelons que les dermatophytes ne possèdent que 4 chromosomes (97,98) ce qui nous a obligé à analyser pour chaque croisement suffisamment de descendants F_1 , la probabilité pour que deux gènes différents se trouvent sur le même chromosome étant relativement élevée .

Afin d'obtenir une souche témoin résistante de signe(-) , nous avons confronté des souches sauvages de signe (+) et de signe (-) avec huit souches résistantes ,descendantes F_1 du croisement n°4 (tableau n°2). Les huit essais donnèrent des cléistothèces pour le croisement avec la souche (-) , il n'y avait donc parmi les huit F_1 testés aucune souche recombinée résistante de signe (-) .

Nous avons recommencé l'expérience , sans plus de succès , avec 30 cultures issues d'ascospores descendantes F_1 d'un autre croisement . Il nous a alors semblé que le gène de résistance était très lié génétiquement avec les allèles d'incompatibilité sexuelle .

Pour confirmer cette hypothèse , nous avons repris des cultures F_1 isolées au micromanipulateur (7asques des 11 asques étudiés) . Nous avons toujours

obtenu pour ces 7 asques , 4 ascospores résistantes de signe (+) et 4 ascospores sensibles de signe (-) ,sans jamais observer de recombinaison . Cette liaison génétique entre les gènes de résistance et de compatibilité sexuelle pourrait peut-être expliquer pourquoi , comme nous l'avons signalé au début de ce chapitre , le croisement entre souche sensible et souche résistante est difficile , la déficience d'un gène entraînant parfois des altérations dans l'expression de ses voisins .

De plus , nous avons observé pour l'une des souches résistantes la perte de l'hétérothallisme , cette souche étant capable de donner des cléistothèces seule , sur milieu au flocon d'avoine . Bien que l'on ne puisse exclure une erreur expérimentale survenue au cours de la micromanipulation , erreur due à la très petite taille des ascospores , on ne saurait non plus écarter l'hypothèse retenue par KYUNG JOO KWON-CHUNG (54) , selon laquelle il y aurait une altération du mécanisme d'expression des allèles d'incompatibilité (+) et (-) . Notons que la formation de diploïdes a déjà été signalée chez Microsporum gypseum (49) et pourrait également expliquer ce phénomène .

Plutôt que de continuer à rechercher des recombinaisons hypothétiques dans la descendance de tous

nos croisements , ce qui aurait été certainement très long et peut-être impossible , nous avons abandonné cette méthode et recommencé une nouvelle mutagénèse sur une souche sauvage de signe (-) , rendue isogène avec la souche sauvage de signe (+) selon la technique de Prévot (79,95) . Cette isogénisation a été réalisée en croisant 6 fois de suite un descendant F_1 de signe (-) avec la même souche parentale de signe opposé ("Back-Cross").

La technique de recherche des mutants était identique à celle décrite dans le chapitre I . L'une des souches mutantes résistantes a été choisie et a tout d'abord été analysée par la méthode des étalements en masse . Nous donnons les résultats au tableau n°4 , qui démontrent que cette souche est bien monogénique .

Nous présentons dans le tableau n°5 , des résultats de croisements réalisés par la suite , entre les souches résistantes de signe (+) et la souche témoin résistante de signe (-) . Le paramètre X^2 de conformité à l'hypothèse 100% de résistants est toujours très inférieur à la limite de 3,81 pour 1 degré de liberté . Nous pouvons donc conclure que nos souches résistantes possèdent toutes une mutation au même locus .

Tableau n°4. Analyse génétique d'un mutant résistant de signe (-).

Total	Résistants	Sensibles	X^2
298	145	153	0,08

Tableau n°5. Résultats des croisements des mutants résistants de signe (+) contre la souche résistante de référence.

Mutant n°	Total	Résistants	Sensibles	X^2
2	146	146	0	0,00
15	60	53	7	0,82
21	296	302	-	0,12
1532	497	479	18	0,65
1512	284	270	14	0,69

Remarquons que si cette étude directe n'avait pu être faite , dans le cas où nous n'aurions pas pu obtenir la souche de référence résistante de signe (-) , ou si les croisements avaient été stériles , la recherche de la liaison du gène de résistance avec celui d'incompatibilité sexuelle aurait pu être réalisée pour chaque cas , et donner ainsi une preuve indirecte mais moins indiscutable de l'existence d'un locus unique , responsable du phénotype résistant .

Conclusion

Les résultats des expériences mentionnées précédemment montrent que nous pouvons disposer pour la deuxième partie de nos travaux de mutants monogéniques stables , résistants à la griséofulvine . Tous les mutants analysés sont identiques ,aucun recombiné sensible n'ayant pu être trouvé dans la descendance de parents résistants. Le fait que tous nos mutants , obtenus séparément les uns des autres , aient tous reçu la même modification héréditaire nous conduit à prévoir l'existence d'un mécanisme de résistance assez spécifique .

Dans la suite de nos travaux , nous avons toujours utilisé le mutant résistant portant le n°21 .

DEUXIEME PARTIE

Etude du mécanisme de l'action fongistatique de la griséofulvine chez Arthroderma simii , et recherche du mécanisme de la résistance

CHAPITRE I - Etude et modifications du pouvoir fongistatique de la griséofulvine

Nous avons tout d'abord cherché à évaluer l'action fongistatique de la griséofulvine sur le mutant résistant .

Les conditions opératoires étaient les mêmes que celles décrites pour l'étude de l'inhibition de la germination chez la souche sauvage (chapitre I, première partie) . En fait , le degré de résistance est nettement supérieur à celui qui peut être déterminé expérimentalement . Il est en effet difficile de préparer des milieux de culture contenant plus de 1000 mcg/ml de griséofulvine , ce qui impose déjà la préparation d'une solution-mère du produit dans la diméthylformamide titrant 100 mg/ml , la quantité de solvant ajouté ne pouvant dépasser 1% .

Nous reproduisons (tableau n°6 et courbe n°2)

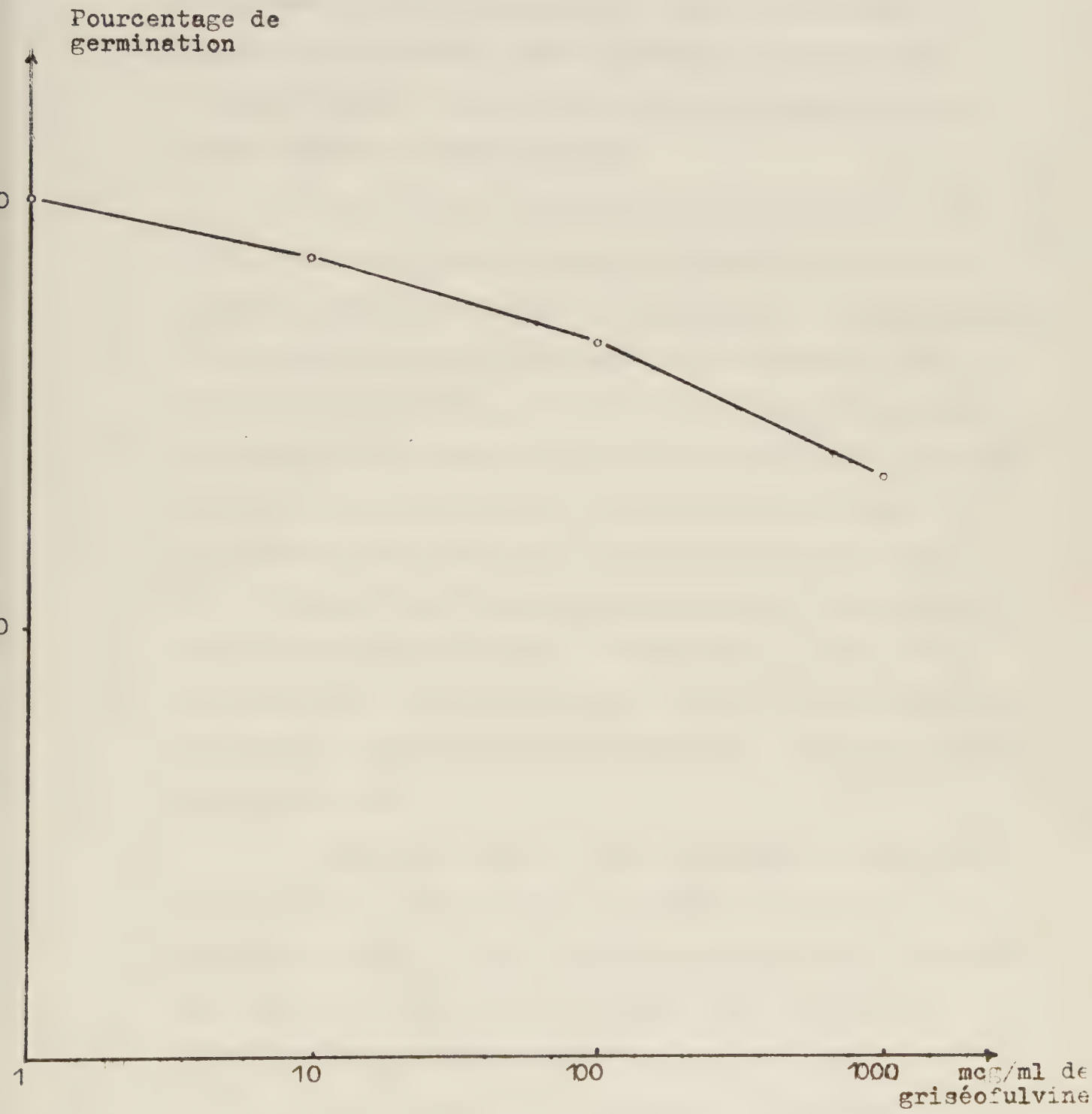
les résultats que nous avons obtenus . Les quelques essais effectués à des concentrations supérieures n'ont jamais donné de résultats reproductibles .

Tableau n°6. Variation du pourcentage de germination des microconidies résistantes sur un milieu solide contenant de la griséofulvine .

Concentration en griséofulvine(mcg/ml)	1	10	100	1000
Pourcentage de germination	100	95	84	69

Nous remarquons que même avec 1000 mcg de griséofulvine par ml , nous avons une germination de 69% des microconidies . Lorsque nous avons fait la même expérience avec des microconidies issues de la souche sauvage (chapitre I,première partie) , nous avons trouvé une inhibition de la germination de 50% en présence de seulement 5 mcg/ml de griséofulvine .

Dans ces conditions bien définies , notre mutant possède donc une résistance exceptionnellement élevée . Il en est de même quand on ensemence un petit semis mycélien sur un milieu MM_{10} additionné de 10 ,



Courbe n°2. Variation du pourcentage de germination des microconidies de la souche résistante sur un milieu solide, en fonction de la concentration en griséofulvine.

100 ou 1000 mcg/ml de griséofulvine . La souche sauvage ne présente dans ces conditions aucune croissance , tandis que le mutant donne une culture abondante en quelques jours , aussi vite que si le milieu nutritif était dépourvu d'antifongique .

Par contre , nous avons obtenu des résultats tout à fait différents lorsque la griséofulvine était ajoutée à une culture déjà en croissance . Cette remarque très importante a déjà été faite par EL NAKEEB (37) . En milieu liquide MM_{10} ou encore en milieu de Sabouraud , l'inoculation de ballons de 250 ml par un peu de mycélium broyé par un mixer permet d'obtenir en 4 à 5 jours une culture abondante : 400 mg pour la souche mutante ou 500 mg pour la souche sauvage en milieu de Sabouraud (ces chiffres représentent une moyenne et sont donnés en poids sec) . Les ballons sont placés dans un agitateur à mouvement rotatif (240 tours/minute) , et la température maintenue à 25°C .

Si l'on répète la même expérience , en incorporant dès le début de 15 à 150 mcg/ml d'antifongique dans les ballons , seul le mutant se développe , donnant une culture de même importance que celle obtenue en l'absence de griséofulvine .

Par contre , si l'addition de griséofulvine ne

suit pas immédiatement l'inoculation des ballons mais est précédée par 24 à 48 heures de culture en milieu sans antifongique , la croissance de la souche sauvage n'est plus inhibée totalement , et sa culture continue à se développer , mais de plus en plus lentement lorsque l'on augmente la concentration en antibiotique .

Ce phénomène permet de supposer, soit que l'inactivation de la griséofulvine nécessite la présence d'une grande quantité de produits de l'activité cellulaire, soit que le pouvoir fongistatique de la griséofulvine est limité aux premières phases de la croissance du champignon .

Mc NALL , en 1960 , a indiqué que des nucléotides en excès pouvaient lever l'inhibition de la croissance provoquée par la griséofulvine chez Microsporum canis (62,63) . Par la suite,cette observation fut souvent négligée dans les différentes tentatives d'explication du mécanisme d'action de la griséofulvine .

Quelques auteurs cherchèrent néanmoins à retrouver ce phénomène . EL NAKEEB , Mc LELLAN et LAMPEN (37)

ont mis en évidence une diminution de la sensibilité à la griséofulvine pour seulement une souche de Trichophyton mentagrophytes , en présence simultanément de 5 mcg/ml d'acide adénylique et de 5 mcg/ml d'acide guanylique . Dans ces conditions , l'inhibition qui était de 56% pour une concentration en griséofulvine de 10 mcg/ml ,était ramenée à 19% .

Ces auteurs ont également noté que les nucléotides pyrimidiques sont sans action . De plus,cette diminution de l'inhibition n'a pas été retrouvée chez Microsporum gypseum et chez une autre souche d'origine différente de Trichophyton mentagrophytes . Une telle action antagoniste contre l'inhibition par la griséofulvine n'a pas non plus été observée chez Botrytis cinerea (51) .

Nous avons réalisé la même expérience sur nos deux souches , Arthroderma simii , sensible et résistante. Nous avons employé les acides adénylique et guanylique . 10 mcg/ml de chacun de ces deux nucléotides puriques ont été ajoutés au milieu de culture . Des témoins sans nucléotide ou avec un seul nucléotide , à la même concentration,ont été réalisés . Les essais ont été faits avec 5 mcg/ml de griséofulvine dans le milieu gélosé pour la souche sauvage sensible et nous avons utilisé 500 mcg/ml pour la souche résistante . Les

Tableau n°7. Effet de nucléotides puriques sur l'inhibition de la germination des microconidies d'Arthroderma simii.

Substrats nutritifs	Pourcentages de germination	
	Sauvage(5mcg/ml)	Mutant(500mcg/ml)
MM_{10}	100%	100%
MM_{10} + griséofulvine	52%	79%
MM_{10} + griséofulvine + acide guanylique	54%	80%
MM_{10} + griséofulvine + acide adénylique	48%	81%
MM_{10} + griséofulvine + acides adénylique & guanylique	59%	83%

conditions étaient celles qui nous avaient permis d'établir la courbe de germination des microconidies en présence de griséofulvine (chapitre I,première partie). Les résultats de ces expériences sont donnés dans le tableau n°7 .

Nous avons donc obtenu,lorsque les deux nucléotides étaient présents une légère diminution de l'inhibition de la germination des microconidies . A notre avis , cette diminution n'est pas significative . En effet , ce phénomène qui n'a pas été mis en évidence sur toutes les souches et reste très contesté dans la bibliographie , pourrait tout simplement être dû à l'enrichissement du milieu nutritif en nucléotides , substrat de choix pour les synthèses d'acides nucléiques, très importantes lors de la germination des spores .

CHAPITRE II - Etude des modifications macroscopiques de la morphologie des cultures sous l'influence de la griséofulvine

a) Cultures en l'absence de griséofulvine

Macroscopiquement , les différences de la morphologie des cultures existant entre les souches sauvage et mutante peuvent être importantes .

Sur milieu MM_{10} solide , en boîte de Petri ou en tube , nous obtenons une culture abondante , blanche et duveteuse dans les deux cas . La croissance est toujours un peu plus rapide pour la souche sauvage , ce phénomène ayant déjà été signalé .

En revanche , les cultures agitées en milieu liquide , décrites au chapitre précédent , présentent un aspect très différent . Pour la souche sauvage , le milieu est trouble en 24 heures et l'aspect est immé-

diatement très homogène . Par contre , le mutant s'agglomère en petites boules et la partie liquide d'une culture de 5 jours reste pratiquement limpide (photo n°1) . Nous avons effectué des prélèvements pour rechercher si ces différences morphologiques se retrouvaient au niveau cellulaire . Des observations microscopiques ont montré l'existence de filaments , de microconidies et de rares macroconidies . La culture sauvage est formée de très nombreux petits amas d'hyphes , se répartissant d'une manière homogène . Dans la culture mutante ces amas sont par contre plus gros et moins nombreux .

Les mêmes cultures en milieu liquide sans aucune agitation sont également très différentes . Alors que la souche sauvage présente dans ces conditions un voile important en surface , la souche mutante , elle , ne possède jamais ce voile , et la croissance se fait uniquement en profondeur (photo n°2) .

b) Culture en présence de griséofulvine

Notre souche sauvage est capable de croître sur un milieu solide contenant 2 à 5 mcg/ml de griséofulvine . Le thalle est alors plus serré , plus compact et moins

Photo n°1

Cultures de souches sauvage (à gauche) et mutante (à droite), soumises à une agitation continue (240 t/mn).

Photo n°2

Cultures des souches sauvage (à gauche) et mutante (à droite), laissées au repos.

Photo n°3

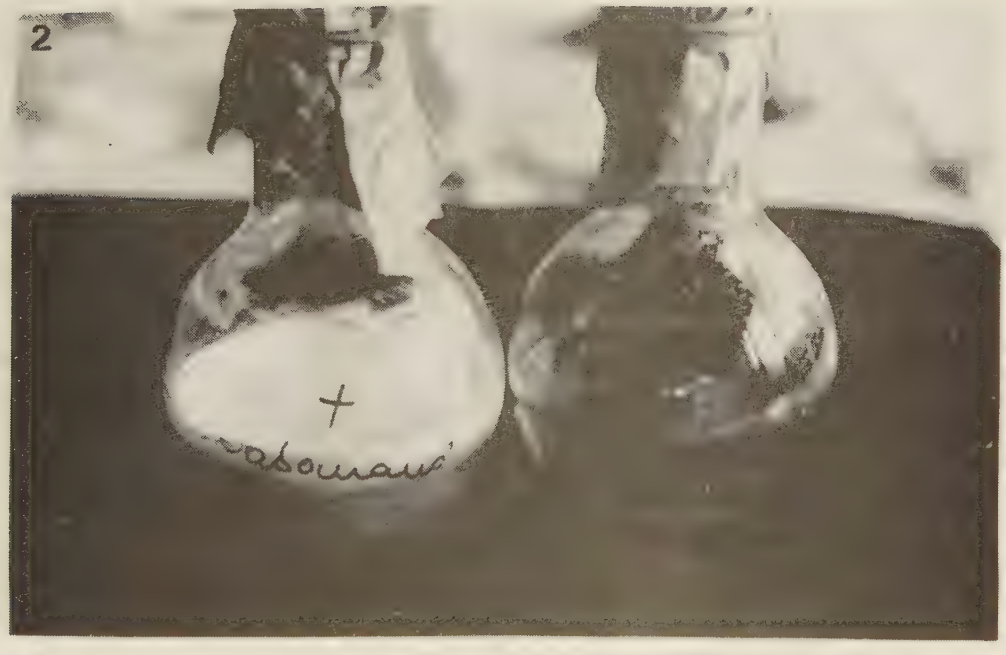
Mycélium d'un mutant morphologique d'Arthroderma simii se développant uniquement en profondeur dans la gélose.

étendu que sur une culture effectuée sans antifongique . La partie du mycélium poussant en profondeur , sous la couche duveteuse , est très peu abondante et également très compacte .

Le mutant résistant , au contraire , a sur milieu MM_{10} additionné de griséofulvine un développement aussi important que sur milieu sans antibiotique , même si la concentration atteint 100 mcg/ml . L'aspect duveteux extérieur est identique . Par contre, si l'on retire par grattage les hyphes aériennes , la partie du mycélium se développant en profondeur , dans la gélose , apparaît beaucoup plus abondante pour les fortes concentrations en antifongique , et en général elle finit par envahir toute la boîte de Petri . Elle est divisée et souvent très étendue .

En milieu liquide , les deux souches conservent les mêmes caractéristiques que celles observées au cours de la culture sans griséofulvine .

Cette croissance préférentielle à l'abri de l'air observée chez le mutant nous a conduit à supposer l'existence d'une modification des processus oxydatifs en présence de l'antibiotique . Nous avons donc essayé d'appliquer les techniques utilisées pour



les bactéries anaérobies , en gélose profonde ou en jarre , cela sur différents substrats nutritifs . Il ne nous a jamais été possible de mettre en évidence une culture dans ces conditions . Notons que , dans des recherches systématiques de mutants morphologiques , nous avons trouvé un mutant qui présentait sur milieu MM_{10} un mycélium rappelant celui de la souche résistante en présence de griséofulvine (photo n°3) .

Conclusion

Les caractères culturaux de nos deux souches sont donc très proches , et l'examen de leur morphologie ne nous a donné aucun renseignement suceptible de nous éclairer sur le mécanisme de la résistance . Il serait intéressant de rechercher pour quelles raisons le mutant pousse abondamment en profondeur dans la gélose en présence de l'antifongique . Mais nous ne pensons pas que ce phénomène soit en relation directe avec le mécanisme d'action de la griséofulvine . En effet , il a été démontré par ailleurs que cette substance n'avait aucun effet sur la respiration , ceci sur de nombreuses souches sensibles différentes (20,51,56,75,85) .

La résistance à la griséofulvine ne peut donc être expliquée par l'induction d'une autre voie du métabolisme carboné , phénomène qui a été signalé chez la levure . Saccharomyces cerevisiae possède en effet les deux voies de dégradation des sucres : la respiration et la fermentation . SLONIMSKI et ses collaborateurs (15,90) ont pu ainsi mettre en évidence des mutants résistants à l'érythromycine et au chloramphénicol et démontrer que la possibilité de remplacer la respiration altérée par la fermentation permettait d'étudier et d'observer le phénotype résistant .

CHAPITRE III - Etude microscopique des modifications des caractéristiques morphologiques et cytologiques des cultures

a) Techniques

Des cultures sur lame de nos deux souches , sensible et résistante , ont été réalisées selon la technique de Gougerot . Nous avons utilisé indifféremment le milieu MM_{10} ou le milieu de Sabouraud , en présence de 2 et 5 mcg/ml de griséofulvine pour la souche sauvage , de 2 , 5 , 10 , 50 et 200 mcg/ml de griséofulvine pour le mutant résistant . Des cultures témoins sans griséofulvine ont été réalisées parallèlement .

Selon la souche et le milieu de culture , diverses colorations ont été faites sur des thalles âgés de 6 à 10 jours . Les préparations étaient fixées

par de l'alcool ammoniacal , sauf pour la coloration nucléaire de Giemsa où le mélange de Carnoy (3 parties d'alcool absolu et une partie d'acide acétique) a été utilisé . Dans ce cas , après 5 minutes de fixation , les lames étaient plongées dans l'alcool absolu puis dans l'alcool à 70° ; les lames non utilisées immédiatement pouvaient être conservées dans l'alcool à 70°.

Pour étudier les caractéristiques microscopiques des hyphes sensibles et résistantes formées en présence ou en absence de griséofulvine , nous avons regardé au microscope des filaments colorés ou non :

- l'observation directe après fixation et sans coloration permet de bien voir les cloisons entre les différents articles .

- la coloration au bleu lactique de Guegen convient à l'observation de la morphologie de la culture (forme des hyphes , présence ou absence des micro et macroconidies) .

- la coloration à l'orcéine acétique révèle la chromatine des noyaux (48,97) . Il faut tout d'abord préparer une solution-mère d'orcéine en dissolvant 1 g d'orcéine dans 45 ml d'acide acétique . La dissolution se fait à chaud et sans ébullition . Il est absolument

nécessaire de filtrer après refroidissement afin d'éviter les dépôts . Au moment de l'emploi , on mélange 1 ml de la solution-mère avec 1 ml d'eau du robinet et 1 goutte d'acide chlorhydrique N .

Les lames sont recouvertes par ce réactif et chauffées avec précaution au-dessus de la veilleuse d'un bec Bunsen jusqu'à émission de vapeur . Cette opération a pour but de permettre au colorant de pénétrer dans les cellules . Après chauffage , les lames, toujours recouvertes de colorant , sont conservées 24 heures dans une boîte de Petri fermée . Le lavage final se fait à l'eau du robinet .

Cette technique permet d'obtenir des préparations où les noyaux sont bien visibles et surtout peu déformés . Les constituants du cytoplasme qui n'ont pas été hydrolysés ne gênent pas l'observation des noyaux . De plus , les cloisons séparant les articles , non colorées , sont ainsi bien visibles , ce qui permet d'évaluer facilement le nombre de noyaux par article . Par contre , cette coloration ne convient pas à l'observation des microconidies dont les noyaux se distinguent assez mal du reste du cytoplasme .

- <u>la coloration nucléaire de Giemsa</u> est plus favorable à l'observation des noyaux . Cette

coloration est accompagnée d'un éclaircissement du cytoplasme après 15 minutes d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique N à 60°C . Les lames sont ensuite lavées à l'eau distillée et plongées dans un tampon phosphate de pH 7,4 dont la formule est la suivante :

- KH_2PO_4	1 g
- K_2HPO_4	5,3 g
- H_2O	1000 ml

La coloration proprement dite est réalisée en recouvrant pendant deux heures les préparations par le mélange de 5 gouttes de réactif de Giemsa et de 1 ml de tampon phosphate .

Enfin les échantillons sont lavés avec du tampon et observés immédiatement . Cette coloration permet une numération très facile des noyaux , en particulier dans les articles apicaux où ils sont plus nombreux . De même les noyaux des microconidies sont bien visibles . Par contre les cloisons entre les articles sont peu apparentes , rendant parfois difficile la numération du nombre de noyaux par article .

b) Résultats

Les deux souches , sauvage et résistante , présentent une culture de plus en plus ramassée au fur et à mesure que la concentration en griséofulvine augmente . L'observation microscopique nous a montré que les hyphes , assez espacées en l'absence d'antifongique , deviennent très serrées en présence de 5 mcg/ml de griséofulvine pour la souche sauvage et de 50 mcg/ml pour le mutant résistant . Ces hyphes sont toujours de largeur inégale , les parties apicales étant beaucoup plus fines . La griséofulvine dans les deux cas augmente l'importance quantitative des hyphes les plus larges , le ralentissement de la vitesse d'élongation semblant être compensé par l'augmentation de la largeur des articles anciens .

Nous avons remarqué dans ces cultures qui ont en moyenne 8 jours la présence de microconidies , mais leur nombre diminue très sensiblement pour devenir pratiquement nul pour les concentrations élevées en griséofulvine . De plus,il n'y a pas de macroconidies .

La forme des hyphes est très modifiée au contact de la griséofulvine , surtout chez la souche

Photo n°4

Extrémités apicales des hyphes sauvages en l'absence de griséofulvine(X1000).

Photo n°5

Extrémités apicales des hyphes sauvages en présence de 5 mcg/ml de griséofulvine(X200).

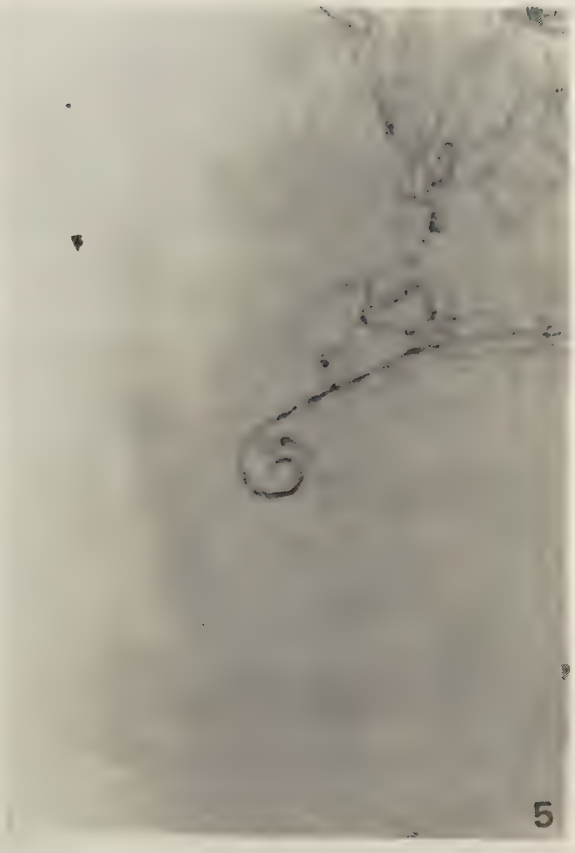
Photo n°6

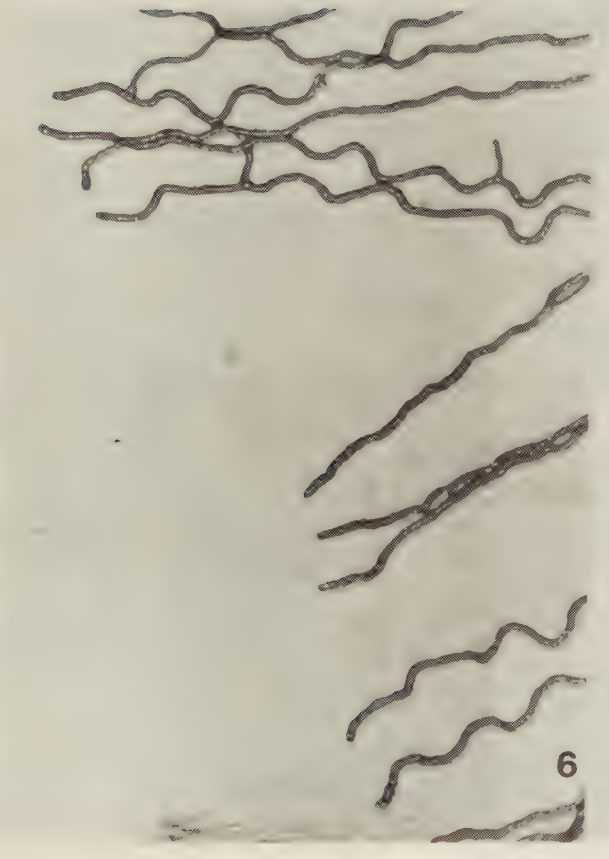
Extrémités apicales des hyphes sauvages en présence de 5 mcg/ml de griséofulvine(X1000).

Photo n°7

Article de la souche sauvage,sans griséofulvine(X2500).

4


5


6

7

sauvage . L'antifongique provoque la formation d'hyphes tordues , cette action étant de plus en plus marquée lorsque la concentration augmente (photos n°4,5,6) . Le mutant présente également ce phénomène mais d'une façon moins importante aux faibles concentrations de griséofulvine .

En utilisant un fort grossissement , nous avons observé un très net raccourcissement des articles en présence de l'antifongique (photos n°7 et 8) . En effet , alors que chez la souche sauvage la plupart des articles sont très longs et peuvent atteindre 50 microns, leur taille diminue dès l'introduction de faibles concentrations de griséofulvine . Ce phénomène est absolument constant des parties anciennes aux parties apicales .

Chez le mutant , en absence de griséofulvine , les articles sont déjà beaucoup plus courts , environ 4 à 20 microns , comme le montre la photo n°9 . Lorsque l'on ajoute 2 à 10 mcg/ml d'antifongique , les déformations sont donc beaucoup plus visibles chez la souche sauvage que chez le mutant résistant qui possède déjà des cloisons plus rapprochées . Par contre , en présence de 50 à 200 mcg/ml de griséofulvine , nous avons observé sur une culture de la souche mutante de profondes

Photo n°8

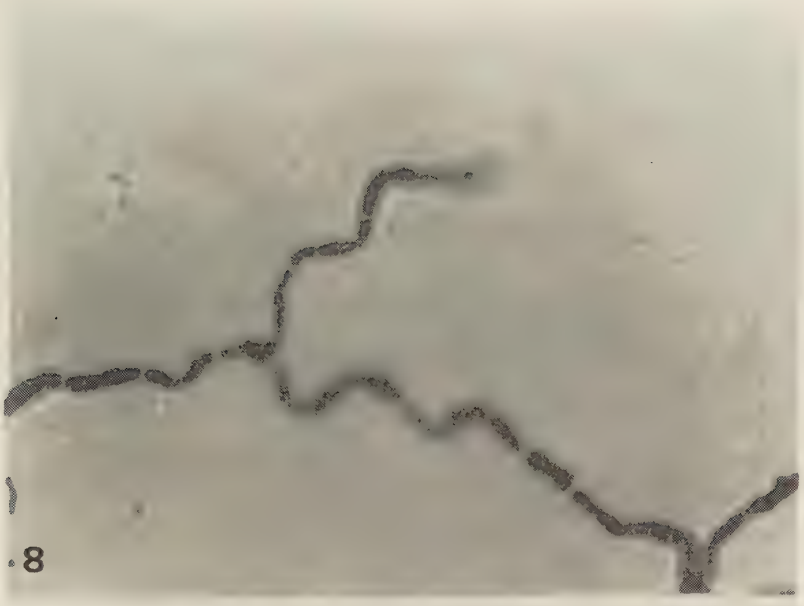
Articles raccourcis chez la souche sauvage en présence de 5 mcg/ml de griséofulvine(X2500).

Photo n°9

Hyphes du mutant résistant n°21,sans griséofulvine.Les cloisons transversales séparant chaque article sont très rapprochées(X3500).

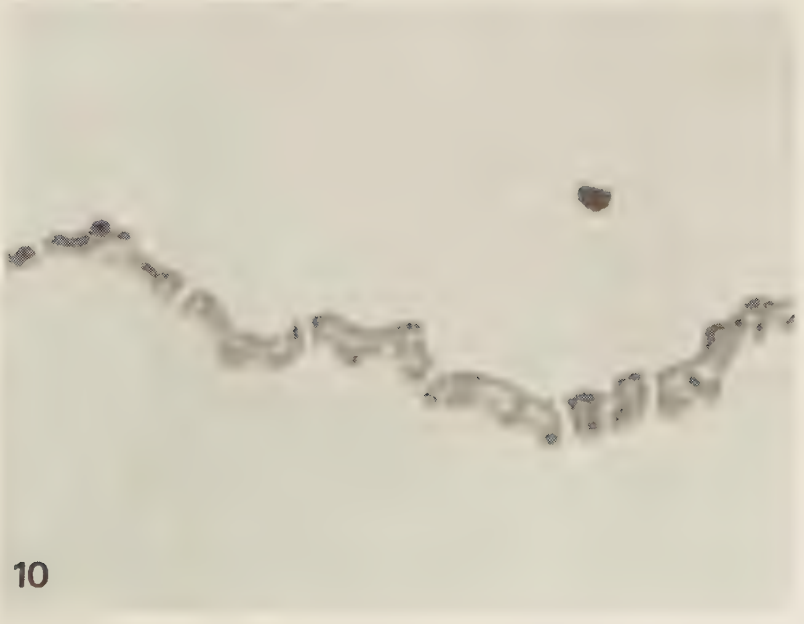
Photo n°10

Mutant n°21 en présence de 200 mcg/ml de griséofulvine (articles âgés,X2500).



8

9



10

altérations de la forme des hyphes , en particulier des articles encore raccourcis et sinueux imposant au filament une forme irrégulière . La photo n°10 représente des articles âgés d'une culture de la souche résistante en présence de 200 mcg/ml de griséofulvine .

Le nombre de noyaux par article est de 1 à 3 dans tous les cas , quelle que soit la souche observée et la concentration en antibiotique , sauf pour les articles apicaux qui peuvent en contenir jusqu'à 10 (photos n°11 et 12) . Aucune différence n'a été relevée pour leur forme comme pour leur nombre ; la griséofulvine ne provoque donc pas de modifications à ce niveau . Par contre , en raison du raccourcissement de tous les articles , y compris les articles apicaux , le nombre de noyaux pour une même longueur de filament apparaît plus élevé en présence de griséofulvine . C'est sans doute ce phénomène qu'ont décrit THYAGARAJAN , SRIVASTAVA et VORA (93) qui ont affirmé sans aucune photo à l'appui, que la griséofulvine provoque une augmentation du nombre des noyaux chez plusieurs dermatophytes sensibles .

Photo n°11

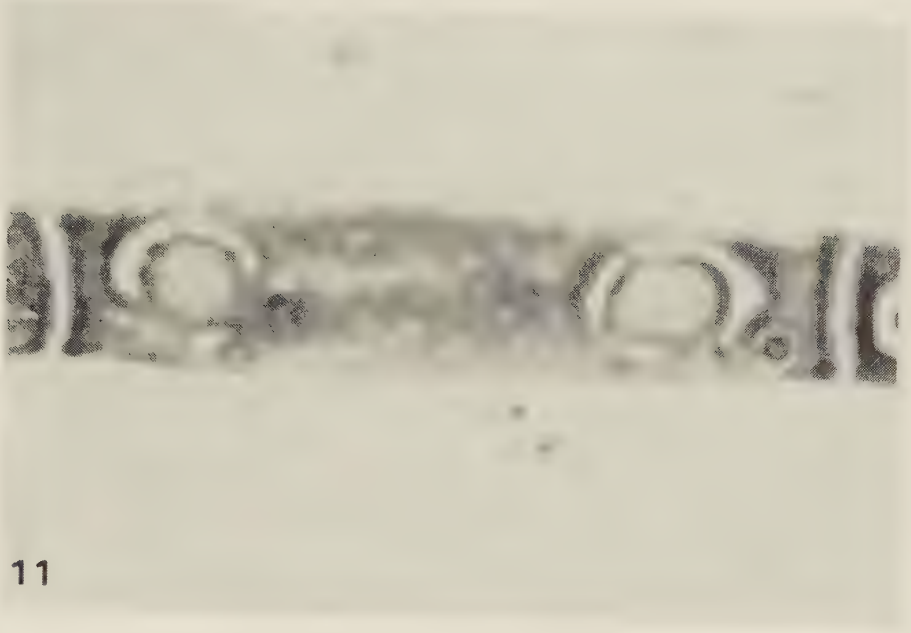
Article du mutant résistant coloré par l'orcéine acétique.Les cloisons entre chaque article restent bien visibles (X6000).

Photo n°12

Coloration de Giemsa sur un article apical mettant en évidence six noyaux.La cloison de cet article est indiquée par une flèche (X2500).

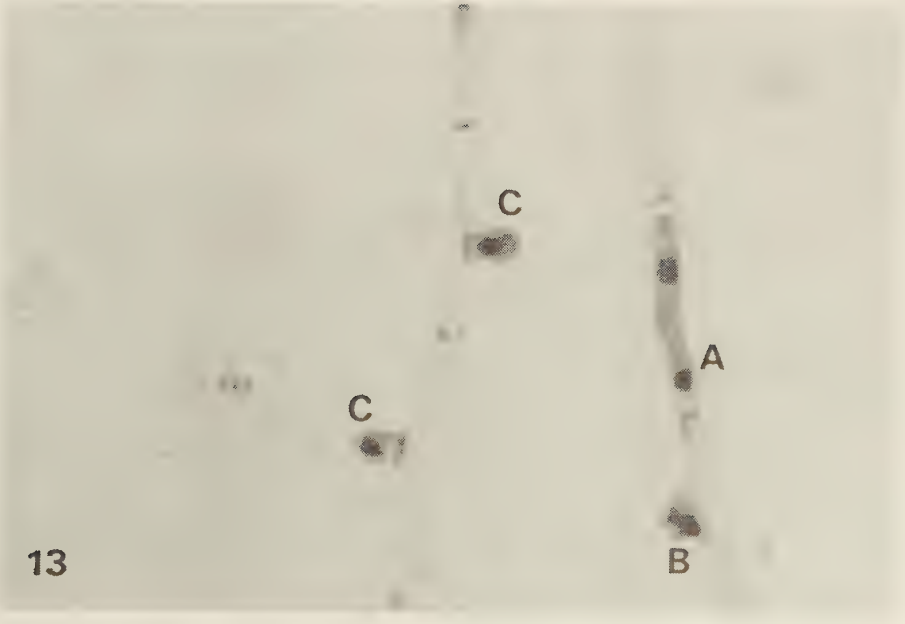
Photo n°13

Coloration de Giemsa montrant la formation des microconidies.On distingue un article avec deux noyaux(A),une microconidie en formation(B),et des microconidies déjà formées,les articles portant ces aleuries ne comportant plus de noyaux(C).(X2500).



11

12



13

En ce qui concerne les microconidies, nous avons observé le phénomène suivant : lorsqu'une microconidie prend naissance sur un article, il n'y a pas division nucléaire et naissance d'une nouvelle cellule , mais simplement formation d'une excroissance de la paroi et passage du noyau de l'article dans cette excroissance qui constitue la spore (photo n°13) . Il en résulte d'ailleurs que les articles portant les microconidies sont anucléés . Or les cultures que nous avons effectuées en présence de griséofulvine étaient beaucoup moins riches en microconidies ; la griséofulvine aurait donc une action non pas sur la formation de nouveaux noyaux , puisque l'élaboration d'une microconidie ne nécessite pas cette formation , mais sur celle de la paroi elle-même .

c) Conclusion

La griséofulvine , aux concentrations permettant la croissance des mycéliums , ne semble donc pas avoir d'action sur le nombre , la taille et la forme des noyaux.

Cet antifongique provoque par contre la formation

d'hyphes tordues , plus larges , avec des articles plus courts et portant moins d'aleuries . L'association de toutes ces observations au fait que le mutant résistant semble posséder dans son génôme une information permettant également un raccourcissement des articles, nous conduit à supposer que , vraisemblablement , la griséofulvine a une action intéressant directement la synthèse de la paroi cellulaire .

CHAPITRE IV - Comparaison de l'incorporation de la griséofulvine par les souches sensible et résistante

Afin d'essayer de mettre en évidence une fixation de la griséofulvine sur telle ou telle partie des souches résistante ou sensible , nous avons étudié la répartition de l'antifongique dans différentes fractions cellulaires , en fonction du temps d'incubation .

A) Matériel et technique

1) obtention des mycéliums

Les cultures ont été réalisées dans des ballons de 250 ml incubés à 25°C dans un agitateur thermostaté à mouvement rotatif (240 t/mn) . Nous avons utilisé le milieu de Sabouraud dont la formule est la suivante :

- peptone 10 g
- glucose 40 g
- H_2O 1000 ml

pH 6,2

Afin d'avoir une culture déjà abondante au moment où l'on ajoute l'antifongique , des précultures ont été obtenues en ensemençant les ballons avec 0,5 à 1 ml d'une suspension cellulaire préparée à l'aide d'un homogénéiseur . La griséofulvine dissoute dans la diméthylformamide n'a été additionnée qu'après 48 à 72 heures . Deux techniques différentes ont été utilisées pour séparer le mycélium de la phase liquide , après un temps d'incubation déterminé . Nous avons en effet réalisé soit une centrifugation à 4000 t/mn dans des pots à centrifuger de taille convenable , soit un passage sur des préfiltres dans un appareil Millipore . Dans les deux cas,le mycélium était pesé et le volume de la phase liquide mesuré .

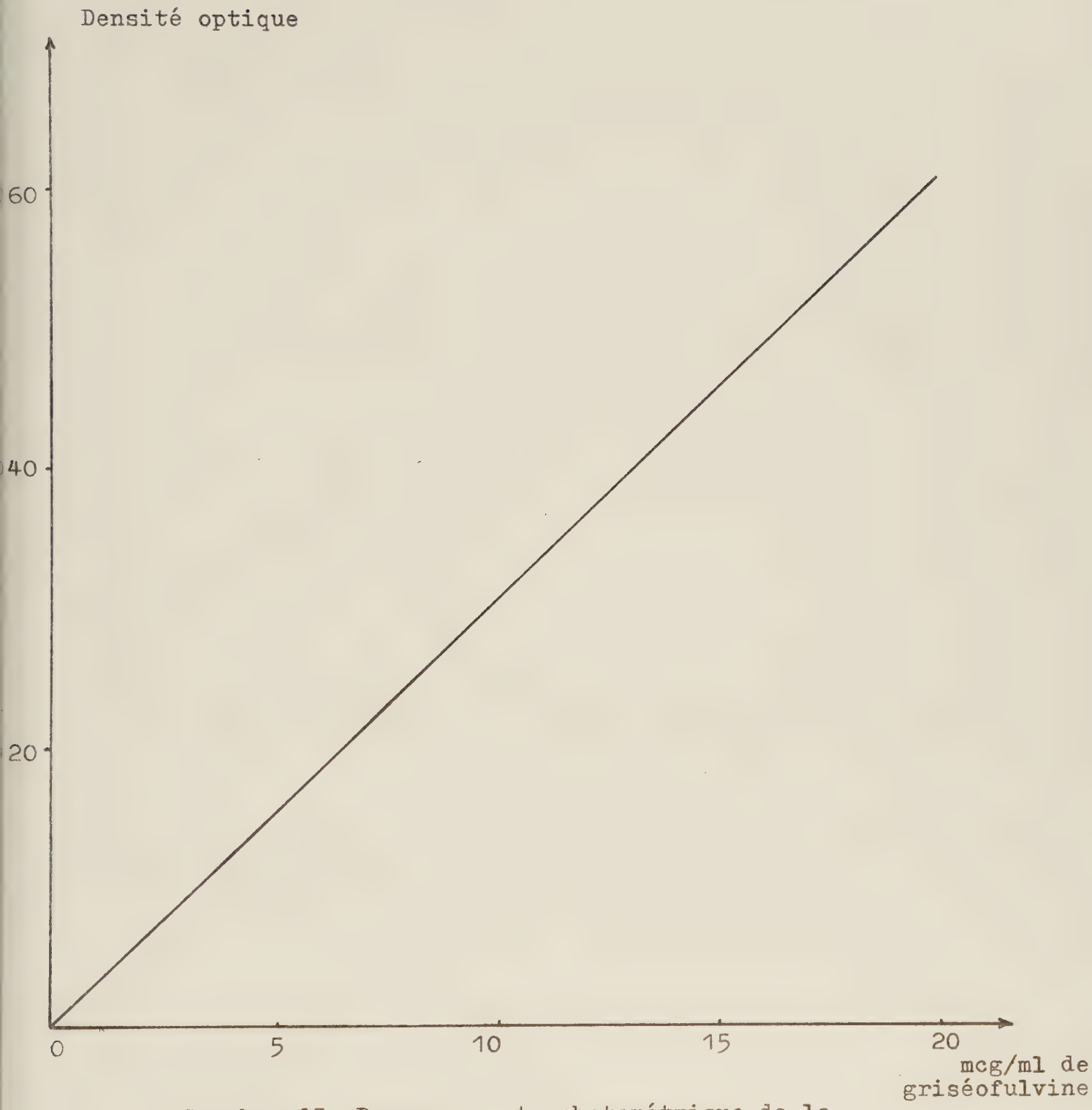
2) détermination du poids sec

Le poids sec de chaque mycélium a été obtenu après dessication d'une partie aliquote préalablement pesée . Nous avons réalisé ces dessications dans une étuve à 100°C , au creux de petits carrés de papier

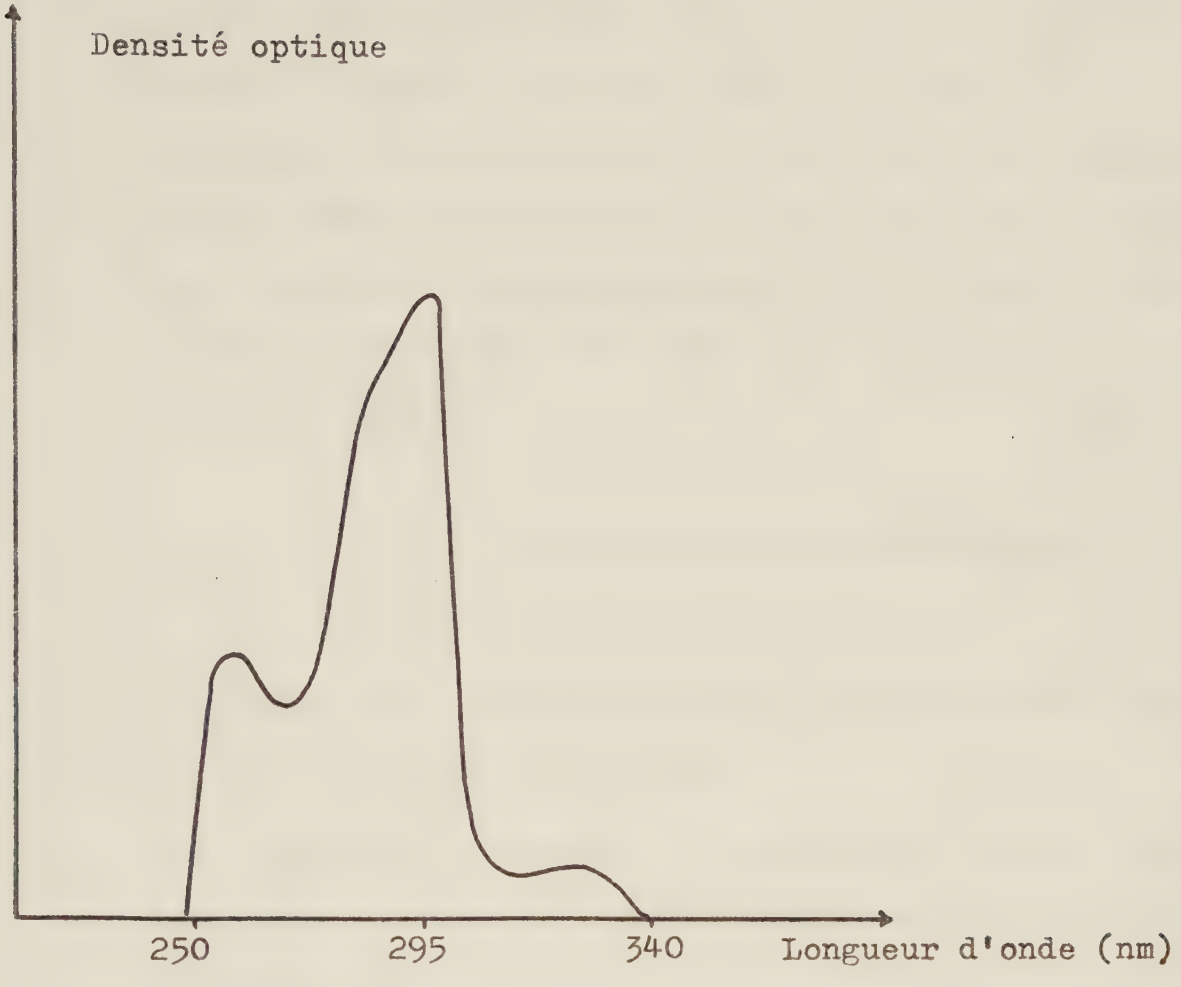
aluminium préalablement tarés . Après refroidissement , chacun d'entre eux a été pesé et la différence nous a donné le poids de la partie desséchée . Cette détermination a été faite pour chaque échantillon , le pourcentage d'hydratation étant assez variable , de 85 à 95% .

3) dosage de la griséofulvine

Nous avons employé pour les dosages de griséofulvine une méthode spectrophotométrique , après extraction par l'acétate de butyle (4,31,57) . L'absorption a été mesurée dans l'ultra-violet à 295,5 nm au moyen d'un spectrophotomètre LERES de type SPILA . Avant tout essai , nous avons préparé une série de solutions de griséofulvine dans l'acétate de butyle , de titres connus et différents , pour établir une courbe étalon . Cette courbe représentant la variation de densité optique en fonction de la concentration en griséofulvine est pratiquement linéaire entre 0 et 20 mcg/ml (courbe n°3). Nous avons toujours réalisé nos mesures entre ces deux valeurs . La vérification du spectre d'absorption de la solution étudiée nous a permis de prouver la spécificité de chaque dosage , le spectre de l'antifongique en solution dans l'acétate de butyle ayant été établi



Courbe n°3. Dosage spectrophotométrique de la griséofulvine dans l'acétate de butyle(295,5nm)



Courbe n°4. Spectre ultra-violet de la griséofulvine en solution dans l'acétate de butyle.

au préalable (courbe n°4) . Toutes les extractions ont été réalisées en tubes spéciaux munis de bouchons fermant à l'émeri , dans des conditions toujours identiques (40 retournements) . Afin de rompre l'émulsion qui se produisait dans certains cas , tous les surnageants qui contenaient la phase organique et la griséofulvine ont été centrifugés à 5000 t/mn avant la lecture de la densité optique .

4) extraction de la griséofulvine

En utilisant la technique décrite par EL NAKEEB et LAMPEN (35) , nous avons séparé successivement les différentes fractions suivantes :

a) Fraction A : lavage à froid du mycélium par 20 ml d'eau glacée suivi d'une centrifugation en centrifugeuse réfrigérée à 4°C .

b) Fraction B : 4 extractions successives par 20 ml d'eau à 80°C pendant 20 minutes , suivies par une centrifugation . Ces 4 fractions sont appelées respectivement B_1, B_2, B_3 et B_4 . Leur concentration en griséofulvine est déterminée séparément et l'ensemble forme la fraction B .

EL NAKEEB et LAMPEN n'ont réalisé que trois

extractions , mais nous avons remarqué que, lors de la quatrième , nous retrouvions encore un peu de griséofulvine . Ce fait est explicable par la grande quantité de mycélium et la plus forte concentration de griséofulvine utilisées dans nos expériences .

c) Fraction C : un lavage à 4°C par de l'acide trichloracétique à 10% , suivi d'une centrifugation à la même température .

d) Fraction D : une extraction à 80°C par l'acide trichloracétique à 5% pendant 20 minutes . Cette fraction renferme les acides nucléiques que nous avons dosés ultérieurement (chapitre V) .

e) Fraction E : il ne nous était pas possible , à cause de notre méthode spectrophotométrique , d'utiliser l'hydrolyse et la solubilisation des protéines par la soude diluée . En effet la griséofulvine ne supporte pas ce traitement , les cycles organiques étant ouverts (35) . Nous avons donc , pour pouvoir comparer nos résultats avec ceux de EL NAKEEB et LAMPEN , effectué une extraction directe de la griséofulvine par l'acétate de butyle sur le résidu de la fraction D.

Remarquons que pour démontrer , en plus de la spécificité du spectre , qu'il n'y avait pas d'absorption parasite , les mêmes fractionnements et dosages ont

toujours été réalisés sur des témoins constitués par des souches sauvage et résistante n'ayant pas eu de contact avec la griséofulvine . Nous avons toujours vérifié que l'absorption était nulle pour ces témoins.

B) Résultats

Nos expériences ont été réalisées en présence de 150 mcg/ml de griséofulvine . En effet , même à cette concentration , la souche sauvage présente encore , en milieu liquide , un développement notable comme l'atteste l'augmentation du poids sec des mycéliums (tableau n°8). Comme nous l'avons indiqué précédemment , l'antifongique n'a été ajouté qu'après l'obtention d'une préculture des deux souches d'environ 400 mg (en poids sec) , puis la totalité des mycéliums contenus dans les ballons a été pesée après 3 heures , 24 heures , 72 heures et 168 heures de contact .

Nous avons ensuite dosé la griséofulvine dans les fractions A,B,C,D,E , et calculé le pourcentage d'antifongique pour chaque fraction , pourcentage rapporté à la quantité totale d'antibiotique effectivement

retrouvée dans le milieu et les mycéliums . Les résultats présentés dans les tableaux 9 et 10 , ont été obtenus au cours de nombreuses déterminations . La griséofulvine retrouvée dans l'eau de lavage des mycéliums (fraction A) a été considérée comme appartenant aux milieux de culture .

Tableau n°8. Augmentation des poids secs de mycéliums après addition de 150 mcg/ml de griséofulvine .

Poids sec	Temps de contact avec la griséofulvine			
	3 heures	24 heures	72 heures	168 heures
Mycélium résistant (en milligrammes)	322	361	447	458
Mycélium sensible (en milligrammes)	433	490	540	568

Afin de compléter ces résultats , les essais suivants ont été réalisés : nous avons d'abord observé le comportement des mycéliums tués par la chaleur humide à 110°C , mis en contact avec l'antibiotique dans les mêmes conditions que les mycéliums vivants . Les mêmes observations ont été faites avec des mycéliums

Tableau n°9. Variationsdes pourcentages de la griséofulvine dans les différentes fractions séparées en fonction du temps d'incubation chez la souche sauvage.

Temps de culture en présence de griséofulvine	Différentes fractions				
	Filtrat+A	B	C	D	Résidus
3 heures	48,3%	50,5%	0%	0,6%	0,6%
24 heures	36,7%	62%	0%	0,7%	0,6%
72 heures	28,6%	70,2%	0%	0,5%	0,7%
168 heures	66,9%	32,1%	0%	0,7%	0,3%

Tableau n°10. Variations des pourcentages de la griséofulvine dans les différentes fractions séparées en fonction du temps d'incubation chez la souche résistante.

Temps de culture en présence de griséofulvine	Différentes fractions				
	Filtrat+A	B	C	D	Résidus
3 heures	54,1%	44,1%	0%	1%	0,8%
24 heures	37,3%	61%	0%	0,6%	1,1%
72 heures	16,4%	82%	0%	0,7%	0,9%
168 heures	41%	57%	0%	0,9%	1,1%

16h heures	44%	97%	0%	0,3%	
72 heures	16,4%	82%	0%	0,17%	
24 heures					
4 heures					

délipidés par un mélange méthanol-chloroforme . En dernier lieu , nous avons broyé dans un broyeur de Poter des mycéliums sensibles et résistants , puis nous avons séparé par passage sur plaque de verre fritté Sovirel de porosité n°1 la phase non filtrable. La vérification au microscope nous a montré l'absence d'articles intacts . Il ne restait que des débris cellulaires . La filtration avait arrêté les morceaux les plus gros , vraisemblablement des fragments de la paroi cellulaire .

Dans toutes ces expériences , des quantités connues de mycélium ont été , après traitement , mises en contact avec la griséofulvine dans des ballons de 250 ml . Ces préparations ont été mises à incuber pendant 18 à 24 heures à 25°C dans l'agitateur à mouvement rotatif . La séparation des différentes fractions A,B,C,D,E a été réalisée et les résultats obtenus sont donnés au tableau n°11 , les valeurs indiquées représentant toujours la moyenne de plusieurs déterminations .

Tableau n°11. Fixation de la griséofulvine sur des mycéliums broyés (privés de la phase filtrable), délipidés ou tués par chauffage à 115°C.

Mycéliums	Souche	Différentes fractions				
		Filtrat+A	B	C	D	E
Broyés	Résistante	30%	68%	0%	1%	1%
	Sensible	24%	75,2%	0%	0,6%	0,2%
Délipidés	Résistante	58%	42%	-	-	-
	Sensible	53%	47%	-	-	-
Autoclavés	Résistante	27%	70%	0%	0%	3%
	Sensible	31,5%	66%	0%	0%	2,5%

C) Conclusions

- La première remarque que nous pouvons faire concerne l'absence d'un pourcentage élevé de fixation sur les acides nucléiques (Fraction D) , contrairement à ce qui a été signalé par EL NAKEEB et ses collaborateurs chez Microsporum gypseum (35) . Cette apparente contradiction est sans doute due à la concentration plus faible de griséofulvine employée par ces auteurs (10 mcg/ml) . En effet , en présence d'une concentration plus forte (150 mcg/ml) , il est vraisemblable que la capacité de fixation de la griséofulvine sur les acides nucléiques est vite saturée . Les produits contenus dans la fraction B , au contraire , pourraient fixer une quantité apparemment beaucoup plus élevée de griséofulvine . Nous pensons donc avoir rendu la méthode plus exacte en utilisant une plus forte concentration d'antibiotique .

- Nos résultats sont parfois très éloignés de ceux publiés par EL NAKEEB et LAMPEN d'une part (37), par HUBER et GOTTLIEB d'autre part (51) . En fait ,ces différences peuvent s'expliquer par des conditions expérimentales peu comparables :

EL NAKEEB et LAMPEN ont utilisé pour la mise en évidence et le dosage de la molécule de griséofulvine, un marquage radioactif par le tritium sur le radical méthoxy en 4 , alors que ce méthoxy est particulièrement labile et hydrolysable rapidement . Ceci a été bien démontré chez plusieurs dermatophytes (14) et nous l'avons vérifié chez Arthroderma simii par chromatographie sur papier (chapitre V) . Cette séparation de la molécule à étudier de son traceur radioactif ne peut que fausser le dosage et il nous semble que les résultats obtenus avec ces techniques sont très discutables . Les auteurs ont d'ailleurs admis (36) que dans les milieux de culture et, après 72 heures d'incubation , 80% de la radioactivité était sous forme d'hydrogène combiné dans une molécule d'eau ou d'un autre corps simple distillable . Le reste de la molécule de griséofulvine n'était donc plus marqué , et de ce fait a pu échapper à l'analyse . De même , dans cette série d'expériences, les auteurs ont remarqué que les solvants organiques ne pouvaient extraire tous les composés radioactifs présents . De plus , dans la fraction protéique obtenue par action de la soude diluée et à chaud , la griséofulvine étant dénaturée , l'antibiotique détruit n'a pas pu être caractérisé qualitativement après dosage .

HUBER et GOTTLIEB , quant à eux , ont employé une griséofulvine marquée par le ^{14}C sur les trois méthoxy présents en 4,6 et 2' . Ce point nous a été précisé par le laboratoire ayant fourni la molécule (11). Ceci rend les dosages de radioactivité plus fidèles si l'on suppose toujours , ce qui n'a pas encore été démontré chez le champignon utilisé (Botrytis cinerea), qu'il existe également au plus une simple monodéméthylation . Par contre , ces auteurs ont conclu à une fixation importante de la griséofulvine sur les lipides, après extraction de 47% de la radioactivité présente dans le mycéliums par le mélange chloroforme-méthanol. Ceci nous semble être une conclusion un peu hâtive . En effet , si le mélange chloroforme-méthanol réalise une bonne extraction des lipides , le chloroforme est également un très bon solvant de la griséofulvine . Il a été utilisé (37) pour extraire cet antibiotique de différentes fractions cellulaires ou des milieux de culture . L'extraction conjointe des lipides et de la griséofulvine par le même solvant ne peut permettre , nous semble-t-il , d'affirmer que la totalité de l'antifongique extrait dans ces conditions était fixé sur des lipides dans la cellule vivante .

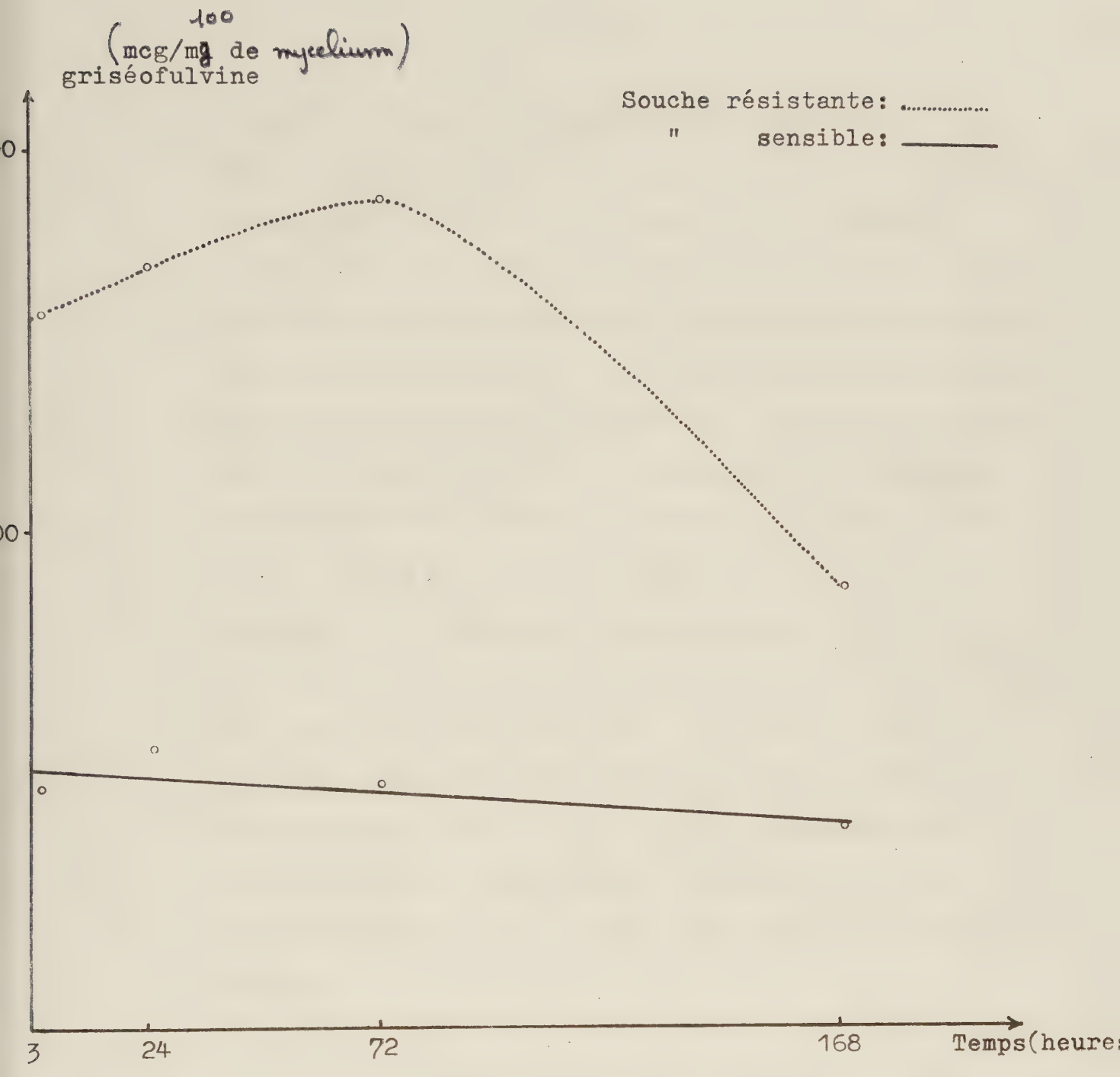
- Si l'on fait le bilan de la griséofulvine introduite dans le milieu de culture et de celle qui a été réellement retrouvée au cours des dosages , il apparaît toujours un déficit plus ou moins grand selon les cas . En rapportant la quantité d'antifongique disparue à 100 mg de mycélium exprimé en poids sec , nous avons obtenu les résultats consignés dans le tableau n°12 . La perte en griséofulvine a été à peu près constante chez la souche sauvage (1500 mcg sur un total de 15000 mcg , soit environ 10%) .

Pour expliquer cette perte , l'hypothèse la plus simple consiste à supposer une disparition par hydrolyse de la molécule d'antifongique . Cependant cette explication ne nous semble pas très valable car la quantité de griséofulvine déficitaire , maximale après 3 jours , redevenait minimale après 7 jours d'incubation pour le mutant résistant . La réapparition d'une quantité supplémentaire extractible dans les milieux de culture serait sans doute liée au vieillissement des cellules , qui libéreraient de l'antifongique dans les milieux de culture . Ce phénomène est illustré par la courbe n°5 .

Nous avons également des raisons d'écarter la possibilité d'une mauvaise extraction par l'acétate

Tableau n°12. Quantité de griséofulvine manquante, exprimée en microgrammes de griséofulvine pour 100 milligrammes de mycélium, après plusieurs temps d'incubation.

Type de mycéliums	Souche	
	Mutante	Sauvage
VIVANTS, après 3 heures	820	280
" 24 heures	875	318
" 72 heures	955	280
" 168 heures	505	225
BROYES, après 24 heures	950	312
DELIPIDES, après 24 heures	215	119
AUTOCLAVES, après 24 heures	210	61



Courbe n°5. Variation du déficit en griséofulvine chez les souches sensible et résistante, en fonction du temps d'incubation.

de butyle sur les différentes fractions A,B,C,D . En effet , d'une part nous avons pu retrouver pour certains dosages jusqu'à 92% de la griséofulvine introduite , d'autre part nous avons pu prouver la qualité de l'extraction en déposant quelques fines gouttes des résidus sur du papier Whatman n°1 . Après séchage , la présence de la griséofulvine non extraite par l'acétate de butyle aurait été détectée par une fluorescence très intense en lumière ultra-violette , ce qui n'a pas été le cas .

Nous pouvons donc affirmer que au moins une partie de la griséofulvine manquant à notre bilan , était dans la fraction E , et qu'elle n'était pas extractible par le solvant organique . Afin de la retrouver, nous avons essayé des hydrolyses enzymatiques sur ce dernier résidu . Nous avons employé successivement , après un lavage à l'eau chaude des mycéliums , les enzymes suivants dans les conditions de leur efficacité maximale :

- papaïne à 50°C ; pH 6,2 ; 10 mg/ml .
- lipase 4000 à 37°C ; pH 6,2 ; 10 mg/ml .
- RNAse à 60°C ; pH 4 ; 10 mg/ml .
- DNAse à 37°C ; pH 6,2 ; 2,5 mg/5 ml .

Après un temps d'incubation de 24 heures , nous avons tenté d'extraire , sans succès , de la griséofulvine

par 30 ml d'acétate de butyle . Des techniques d'analyse biochimique plus perfectionnées pourraient peut-être nous permettre d'isoler un complexe formé d'une substance inconnue et de griséofulvine .

Cette fixation , très importante chez la souche résistante après 3 jours de contact avec l'antibiotique , a probablement lieu dans la paroi cellulaire. En effet , chez le mutant la partie non filtrable des mycéliums broyés , constituée surtout de paroi , fixe autant de griséofulvine que les cellules intactes . Il serait intéressant de savoir quelle est la nature de cette fixation , qui doit mettre en jeu des macromolécules , en général insolubles , ce qui expliquerait les difficultés d'extraction que nous avons rencontrées .

CHAPITRE V - Variation de la teneur de quelques composants cellulaires . Modifications de la structure chimique de la griséofulvine

Nous avons indiqué dans notre introduction , que tous les dosages effectués pour rechercher une différence dans la teneur des constituants cellulaires n'avaient donné que très peu de résultats . Ces dosages , effectués comparativement entre une souche se développant sur milieu nutritif additionné ou non de griséofulvine , ont montré que les taux en acides aminés , protéines , glucoprotéines , glucides , phosphates , nucléotides , chitine et lipides restent stables (40,51) . Les seuls constituants présentant de notables modifications sont les acides désoxyribonucléiques , résultats obtenus chez Microsporum gypseum (37) et chez Botrytis cinerea (51). D'après ces travaux , leur concentration augmenterait rapidement lorsque l'on ajoute de la griséofulvine au

milieu de culture . Les résultats obtenus concernant les acides ribonucléiques sont eux très contradictoires.

Nous avons donc choisi de nous limiter au dosage des acides nucléiques et des lipides totaux , ces derniers étant les principaux fixateurs de griséofulvine selon HUBER et GOTTLIEB (51) . Nous avons également fait des chromatographies sur papier , afin d'essayer de mettre en évidence des modifications chimiques de la griséofulvine , après culture de nos souches sensible et résistante en présence de l'antifongique .

1) Dosage des acides nucléiques

a) Technique de dosage

Nous avons employé une technique déjà utilisée avec succès dans notre laboratoire sur Escherichia coli et Staphylococcus aureus . Elle consiste en une extraction des acides nucléiques par l'acide perchlorique 0,5 N à 70°C ,extraction précédée par un lavage à l'eau glacée , puis à l'acide perchlorique 0,5 N à froid . Les centrifugations se font dans les deux cas à 4°C . Ces méthodes d'extraction sont celles de SCHNEIDER (87) modifiées

par WISSEMAN (99) .

Le dosage proprement dit des acides nucléiques est ensuite réalisé par la classique méthode de DISHE (30) modifiée par BURTON (16) pour l'ADN (réactif à la diphénylamine et lecture à 600 nm) , et la méthode de BIAL (12) modifiée par MOULE (65) pour l'ARN (réactif à l'orcinol, lecture à 665 nm) .

Nous ne décrirons pas le protocole opératoire , qui a été relaté en détail par SEBASTIEN (88) . Cet auteur a également étudié la spécificité des réactions colorées employées , démontrant que celle à la diphénylamine est bien spécifique,tandis que l'ADN peut interférer dans la réaction à l'orcinol . La réaction est en effet seulement huit fois plus sensible pour l'ARN que pour l'ADN .

Nous avons essayé d'améliorer l'extraction des acides nucléiques en réalisant , avant d'ajouter l'acide perchlorique , un broyage des mycéliums (broyeur de Poter) . Dans le même but nous avons , dans une autre série de dosages , remplacé l'acide perchlorique 0,5 N par de l'acide trichloracétique en solution à 5% , l'extraction se faisant à 70°C (37) . Dans les deux cas ,

nous avons obtenu les mêmes résultats que par la technique originale .

Toutes les mesures de densité optique ont été faites au moyen d'un spectrophotomètre LERES de type SPILA .

b) Résultats et conclusions

Nous donnons dans le tableau n°13 les variations de l'ADN et de l'ARN pour le mutant et la souche sauvage. Les cultures ont été réalisées dans des ballons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de Sabouraud liquide . Ces ballons ont été mis à incuber à 25°C dans un agitateur rotatif (240 t/mn) , la concentration en griséofulvine étant de 15 mcg/ml . Les taux d'acides nucléiques sont rapportés aux poids secs des mycéliums .

Nous obtenons des variations très faibles pour les pourcentages d'ARN des deux souches ainsi que pour ceux d' ADN du mutant résistant . Par contre,le contact avec la griséofulvine semble augmenter le taux d'ADN chez la souche sauvage , le pourcentage passant de 0,17 à 0,31%, soit presque deux fois plus . Notons que,lorsque nous avons refait la même expérience et les mêmes dosages avec des mycéliums se développant en présence de 150 mcg/ml

Tableau n°13. Variation du taux des acides nucléiques en fonction du temps, sur des cultures de souches sauvage et mutante, en présence de 15 mcg/ml de griséofulvine.

Temps de la culture en présence de griséofulvine	ADN		ARN	
	Sauvage	Mutant	Sauvage	Mutant
3 heures	0,17%	0,22%	2,40%	2%
24 heures	0,20%	0,21%	2,65%	2,22%
72 heures	0,27%	0,25%	2,80%	2,95%
168 heures	0,31%	0,25%	2,80%	-

de griséofulvine dans le milieu nutritif , la concentration en ADN pour la souche sensible est restée stabilisée à 0,20%. Ce phénomène est sans doute explicable par le ralentissement assez net de la culture à cette concentration d'antifongique .

Nous retrouvons donc chez la souche sauvage l'augmentation du taux d'ADN après culture en présence de griséofulvine . Ce phénomène est peut-être explicable. En effet , nous avons vu (chapitre III) que le nombre de noyaux pour une même longueur de filament était plus élevé chez la souche sauvage au contact de l'antifongique . Il serait alors normal que l'ADN , constituant essentiellement nucléaire, soit présent en plus grande quantité , l'importance relative des noyaux par rapport aux autres constituants cellulaires étant modifiée après une culture effectuée dans ces conditions . Par contre, l'absence de variation des taux d'ARN confirme les travaux qui montrent la stabilité des synthèses protéiques en présence de griséofulvine .

2) Dosage des lipides totaux

a) technique du dosage

Nous avons utilisé la méthode gravimétrique suivante : la prise d'essai est émulsionnée dans un mélange à parties égales de chloroforme et de méthanol , puis laissée en contact 6 heures avec ce même solvant . La quantité de solvant employé pour 500 mg de mycélium est de 20 ml . Cette extraction est réalisée deux fois . Après filtration,les deux extractums réunis sont évaporés lentement . Le résidu est repris par 5 ml de chloroforme,puis la solution filtrée est évaporée de nouveau dans une petite capsule tarée . Cette capsule est pesée et , par différence , nous obtenons le poids des lipides présents .

b) résultats

Ce dosage a été réalisé sur des cultures de 3 jours et de 10 jours , obtenues en milieu de Sabouraud liquide sans griséofulvine . Nos résultats,présentés au tableau n°14 , sont donnés en pourcentage de lipides extractibles , pourcentage rapporté au poids sec du champignon .

Tableau n°14. Variation du taux des lipides extractibles par le mélange chloroforme-méthanol sur des cultures jeunes et âgées des souches sauvage et mutante .

Age des cultures	Souches	
	Résistante	Sensible
3 jours	5,4%	3,9%
10 jours	6,6%	5,2%

c) conclusions

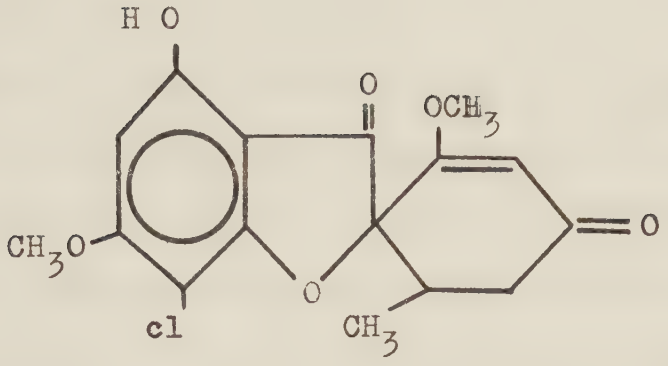
Les résultats précédents montrent qu'il existe une différence entre la teneur en lipides totaux chez les souches sauvage et résistante . Nous constatons également que cette teneur en lipides augmente avec l'âge des cultures , atteignant après 10 jours 5,2% pour le sauvage et 6,6% pour le résistant . Ce dernier résultat nous semble important . En effet , si la fixation de la griséofulvine par le champignon était simplement due à sa solubilité dans les lipides comme le supposent HUBER et GOTTLIEB (51) , on ne pourrait pas expliquer à la lumière de ces résultats la libération de l'anti-fongique dans les vieilles cultures , phénomène que

nous avons mis en évidence au chapitre précédent . Il demeure néanmoins possible que la fixation de la griséofulvine se fasse sur une substance de nature lipidique , mais pour l'instant , aucune donnée dans nos expériences comme dans celles signalées dans la bibliographie ne vient appuyer cette supposition .

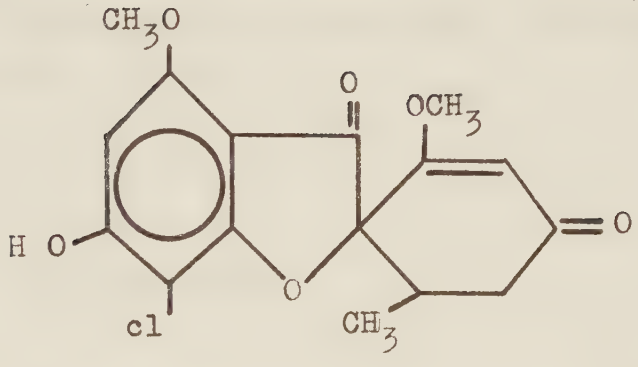
3) Modification chimique de la griséofulvine - Mise en évidence par chromatographie sur papier

Dans un dernier temps , nous avons recherché si la résistance pouvait s'expliquer par l'hydrolyse de la molécule de l'antifongique . La dégradation de la griséofulvine par les champignons a déjà été étudiée et semble très simple (14) : il y a déméthylation en 4 , 6 ou 2' donnant respectivement la 4 déméthyl griséofulvine (Microsporum canis), la 6 déméthyl griséofulvine (Cercospora melonis) ou l'acide griséofulvique (Botrytis alii) (page 101) .

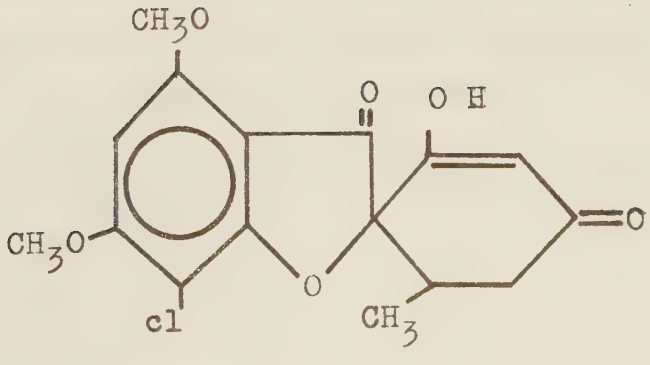
Chacun de ces produits de dégradation est donc différent selon le champignon étudié , et toujours



4-déméthyl griséofulvine



6-déméthyl griséofulvine



2'-déméthyl griséofulvine
(acide griséofulvique)

monodéméthylé . Il semble d'ailleurs que la déméthylation en 4 aille de pair avec une inactivation de la griséofulvine , comme l'ont montré AYTOUN , CAMPBELL et NAPIER (5) . Cette déméthylation peut représenter le premier ou le dernier stade du métabolisme de la griséofulvine . On retrouve bien en effet de fortes concentrations de 4-déméthyl griséofulvine dans le milieu où Microsporum canis a cultivé , mais des dégradations plus complètes sont possibles , par des champignons ou même par des bactéries . Certaines Mucoracées donnent des substances phénoliques simples , les Pseudomonas détruisent totalement la molécule (100) .

a) technique

Nous avons employé une méthode de chromatographie descendante décrite en 1961 et utilisée pour étudier le métabolisme de la griséofulvine chez l'animal, les divers intermédiaires existant pendant la biosynthèse de la griséofulvine et les diverses déméthylations de l'antibiotique survenant au cours de cultures de champignons en sa présence (9,14,81) .

Le solvant employé , composé de benzène (5volumes),

cyclohexane (5 volumes) , méthanol (6 volumes) et eau (4 volumes) , est agité dans une ampoule à décantation et , après deux heures de contact à la température du laboratoire , les deux phases formées sont séparées . La phase lourde est versée dans le fond de la cuve ; le surnageant complété par 0,5% d'acide acétique concentré constitue la phase descendante .

Les différentes solutions à étudier sont déposées en très fines gouttes sur du papier Whatman n°1. Nous avons toujours ajouté un témoin externe de griséofulvine et , dans quelques cas , un peu de griséofulvine à une des fractions étudiées comme témoin interne . La feuille est placée dans la cuve contenant la phase stationnaire 24 heures avant la migration . La durée de développement est de 4 à 5 heures à 25°C . Après séchage, la révélation se fait par l'observation de taches fluorescentes en lumière ultra-violette .

b) <u>résultats</u>

Nous avons réalisé ces expériences sur des milieux de culture contenant 150 mcg/ml de griséofulvine , et dans lesquels les souches sauvage et résistante s'étaient développées pendant 7 jours . Nous avons trouvé

un RF de 0,89 à 0,92 pour la solution de griséofulvine pure dans du chloroforme .

La griséofulvine n'a pas migré, lorsque l'on a utilisé directement les milieux de culture . Dans ces conditions en effet , après développement , la tache fluorescente restait sur la ligne de départ . Nous avons alors extrait la griséofulvine par le chloroforme avant d'effectuer les dépôts . L'antifongique migrait alors normalement , à la même vitesse que les témoins. Nous avons mis en évidence pour les souches sauvage et résistante , à côté d'une tache de même RF que la griséofulvine , une deuxième tache de fluorescence moins intense (RF 0,70 à 0,72) .

c) conclusions

Arthroderma simii hydrolyse une partie de la griséofulvine présente dans le milieu de culture en 4-déméthyl griséofulvine . Ces résultats sont en effet identiques à ceux obtenus par BOOTHROYD , NAPIER et SOMERFIELD (14) qui , après les mêmes expériences de chromatographie , ont montré que la griséofulvine a un RF de 0,90 et que Microsporum canis transforme cette

molécule en 4-déméthyl griséofulvine de RF 0,70 . Ces auteurs ont analysé par des méthodes physiques les différents produits de la dégradation de la griséofulvine (séparation sur colonne d'alumine et caractérisation par le spectre infra-rouge) .

Notons également que les autres produits déméthylés (acide griséofulvique et 6-déméthyl griséofulvine) ont des RF très bas , environ 0,15 à 0,20 ce qui élimine la possibilité d'interférence avec la 4-déméthyl griséofulvine (14) .

En conclusion , il semble que le mécanisme de la résistance ne soit pas dû à une modification du pouvoir de transformation chimique de l'antibiotique en un produit non toxique par le champignon , le même métabolite de la griséofulvine ayant été retrouvé pour les souches résistante et sensible .

CHAPITRE VI - Comportement des souches résistantes à la griséofulvine vis à vis d'autres antifongiques

Les derniers essais que nous avons réalisés ont consisté à étudier la sensibilité de nos deux souches , résistante et sensible , vis à vis de différents antifongiques , afin de voir si nous retrouvions les mêmes différences que vis à vis de la griséofulvine . Nous avons repris pour ces essais la technique exposée au chapitre I , première partie , c'est à dire l'évaluation de l'inhibition de la germination des microconidies par l'antifongique , en fonction de sa concentration dans un milieu nutritif solide .

Chaque antifongique , à la concentration de 1 , 10 et 100 mcg/ml , a été ajouté à du milieu MM_{10} gélosé coulé en boîte de Petri . Selon la solubilité de la substance , une solution-mère a été au préalable préparée dans un solvant convenable . Dans le tableau n°15 nous

Tableau n°15. Recherche de résistances croisées chez le mutant résistant à la griséofulvine avec d'autres antifongiques.

Antifongique	Solvant	Pourcentages de germination					
		1 mcg/ml		10 mcg/ml		100 mcg/ml	
		R	S	R	S	R	S
Griséofulvine	DMF	100	97	95	0	84	0
Nystatine	DMF	84	100	47	80	0	6
Variotine	DMF	79	100	0	0	0	0
Tolnaphtate	DMF	0	0	0	0	0	0
Dimazol	H_2O	100	100	100	100	100	100
Trichomycine	H_2O	94	90	76	-	0	35
Pyrithione	H_2O	0	0	0	0	0	0
5-Fluoro cytosine	H_2O	100	100	100	100	100	100
Diamyceline*	DMF	100	100	100	87	0	0
Pimaricine	DMF	100	100	0	0	0	0
Amphotéricine B	DMF	77	100	0	29	0	0
Clotrimazole**	DMF	0	0	0	0	0	0
Miconazole	DMF	42	100	0	0	0	0

*chlorhydrate de parachloro benzyl 1 méthyl 2 benzimidazole
**chlorophényl 2 imidazolyl1 diphénylméthane

donnons la liste des 13 substances étudiées , de leur solvant et les pourcentages de germination obtenus en en fonction des concentrations en antifongiques .

Nous remarquons que , mis à part un cas où la germination des microconidies est légèrement plus élevée chez le mutant , il n'y a aucune diminution de la sensibilité chez cette souche . Au contraire , dans tous les autres cas , la souche sauvage possède un plus haut pouvoir de germination , sans doute grâce à sa plus grande vitalité .Ces résultats permettent de constater que la sensibilité ou la résistance des 2 souches à la griséofulvine n'a aucun rapport avec leur sensibilité ou leur résistance vis à vis des autres substances étudiées . Il est intéressant de remarquer que chez le mutant résistant à la griséofulvine , certains antifongiques polyéniques (nystatine , amphotéricine B) ont une action fongistatique nettement plus élevée que chez la souche sauvage . Or une des explications du mécanisme d'action proposées pour ces antifongiques polyéniques met en jeu la solubilité de ces substances dans les lipides de la paroi et la formation de complexes stables avec les stérols (55) . Comme nous avons trouvé une plus grande quantité de lipides totaux

dans le mycélium résistant que dans celui de la souche sauvage , sans doute peut-on relier ce résultat à la sensibilité légèrement plus grande des souches mutantes à ces antifongiques polyéniques .

CONCLUSIONS

Le travail que nous avons entrepris a eu pour dessein d'une part l'étude génétique de la résistance à la griséofulvine chez un champignon dermatophyte , Arthroderma simii , d'autre part la recherche de différences physiologiques entre souches résistante et sensible , afin de tenter d'éclairer les connaissances actuelles sur le mécanisme d'action de la griséofulvine .

Nous avons sélectionné divers mutants à partir de la souche sauvage par induction à la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine , et effectué l'analyse génétique de ceux-ci. La technique des étalements en masse des ascospores et l'utilisation du micromanipulateur ont montré que toutes les souches obtenues étaient de simples mutants , tous identiques , les gènes intéressés appartenant au même locus . En effet , il n'a pas été possible d'obtenir par recombinaison des descendants sensibles , après croisement des

mutants résistants de signe (+) avec une souche de référence, résistante également de signe (-) . Ce locus unique est proche de celui des signes de compatibilité sexuelle .

La résistance du mutant étudié s'est révélée très élevée . En effet , alors que chez la souche sauvage 5 mcg/ml d'antifongique ne permettent la germination que de 50% des microconidies , ce pourcentage est de 69% en présence de 1000 mcg/ml d'antifongique chez le mutant résistant. La croissance d'importants semis mycéliens , par contre , est peu gênée chez les deux souches , ce qui montre que l'action de la griséofulvine , in vitro , se traduit surtout par l'inhibition de la germination des spores . Ce résultat est intéressant , car cette phase de la croissance du champignon est très active sur le plan des synthèses , plus particulièrement celles contribuant à l'élaboration de nouvelles parois .

Sur le plan morphologique , les cultures des deux souches sont peu différentes , l'action de la griséofulvine se traduisant néanmoins chez le mutant par une augmentation de l'importance de la partie du mycélium se développant au sein même du milieu de culture , qu'il soit liquide ou solide , sans pour autant pouvoir se développer en milieu anaérobie .

L'examen microscopique des mycéliums sensible

et résistant nous a apporté de nombreux résultats . En effet , nous avons observé que de faibles concentrations en griséofulvine provoquent chez la souche sauvage un raccourcissement des articles , sans modification du nombre des noyaux par article . Comme dans les parties âgées de la culture les hyphes sont plus larges , ces résultats semblent indiquer que la griséofulvine a surtout réduit l'élongation de l'hyphe , peut-être en modifiant les conditions de la synthèse de sa paroi . Le fait que l'antifongique inhibe également la formation des microconidies pourrait venir appuyer cette hypothèse . En effet , lors de la naissance d'une spore sur un article , il y a seulement formation d'une nouvelle paroi pour cette spore , sans division nucléaire supplémentaire . De plus , le mutant résistant possède des articles plus courts que la souche sauvage ; cette observation indique également des modifications de la synthèse de la paroi cellulaire chez la souche résistante .

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de fixation de griséofulvine sur les constituants cellulaires de la souche sensible . Par contre , on observe chez le mutant résistant une fixation de cet antifongique sur les mycéliums vivants et sur des broyats cellulaires constitués de fragments de paroi . Il semble donc que , chez le mutant , la nature

de la paroi soit modifiée, puisqu'il est apparu une capacité de fixation qui n'existe pas chez la souche sauvage .

Quelques auteurs (37,51) ayant déjà , dans des travaux antérieurs, impliqué les acides nucléiques et les lipides dans certaines interprétations du mécanisme d'action de la griséofulvine , nous avons dosé ces constituants , afin de mettre en évidence une incidence possible de la griséofulvine sur le métabolisme fongique . Personnellement, nous avons pu constater une très nette augmentation du taux d'ADN chez la souche sensible , en présence d'antifongique , alors que rien de tel n'a été observé chez le mutant résistant . Par ailleurs , les quantités d'ARN restent identiques chez les deux souches . En ce qui concerne les lipides totaux , leur teneur augmente avec l'âge des cultures et se montre supérieure chez la souche résistante. Peut-être l'augmentation du taux d'ADN trouvé chez la souche sensible en présence de griséofulvine pourrait-elle être une conséquence de l'élévation importante du nombre des noyaux , observée dans les mêmes conditions , l'ADN étant d'origine essentiellement nucléaire .

Nous avons également recherché si la résistance à la griséofulvine pouvait s'expliquer par une destruction de l'antifongique par la souche mutée . Nos expériences nous ont montré qu'il n'en n'était rien . En effet , les

milieux de culture des souches sensible et résistante ont été analysés par chromatographie sur papier , et nous avons trouvé dans les deux cas , à côté d'une tache représentant la griséofulvine intacte , une autre tache de plus faible intensité et dont le RF correspond à celui de la 4-déméthyl griséofulvine .

Nous avons enfin comparé la sensibilité de nos deux souches , sensible et résistante , à quelques antifongiques , afin de voir si la différence de sensibilité vis à vis de la griséofulvine se retrouvait avec d'autres produits . Au cours de ces études , nous n'avons pas constaté de diminution de la sensibilité du mutant aux 13 substances étudiées , ces déterminations ayant été réalisées par l'évaluation du pourcentage de germination des microconidies en présence de doses croissantes d'antifongique .

En conclusion , les expériences comparatives que nous avons réalisées sur les souches sensible et résistante d'Arthroderma simii nous ont surtout permis de mettre en évidence des altérations de la paroi cellulaire chez ce

champignon , en présence de faibles doses de griséofulvine .

Peut-être ces résultats expérimentaux ne sont-ils pas inconciliables avec le pouvoir antimitotique démontré à forte dose par les cytologistes sur tous les types de cellules , et il n'est pas illogique de penser que l'action fongistatique de la griséofulvine chez les dermatophytes puisse s'expliquer par des altérations des rapports entre les divisions nucléaires , qui ne sont pas encore inhibées aux concentrations utilisées , et les synthèses de la paroi du champignon .

B I B L I O G R A P H I E

(1) ABBOT M.T.J.et GROVE J.F. Uptake and translocation of organic compounds by fungi.II.griseofulvin. Exptl. Cell Research (1959) 17, 105.

(2) ANDERSON J.F. Anomalous development of the cuticle of mosquitoes induced by griseofulvin. J. Econ.Entomol. (1966) 59, 1476.

(3) ASCHAN-ABERG K.et THYRESSON N. Hair perforation and griseofulvin sensitivity in routine control of Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes. Acta. dermo. venereol. (1964) 44, 233.

(4) ASHTON G.C.et BROWN A.P. Determination of griseofulvin in fermentations samples.I Spectrophotometric Assay. Analyst. (1956) 81, 220.

(5) AYTOUN R.S.C., CAMPBELL A.H., NAPIER E.J.et SEILER D.A.L. Mycological aspects of the action of griseofulvin against dermatophytes. A.M.A. Arch.Dermatol. (1960) 81, 650.

(6) BALABANOFF V.A.et USUNOV P. Comparative investigations on the resistance of dermatophytes against antimycotic antibiotics. Mykosen (1971) 13, 531.

(7) BANERJEE A.K., BASU N.et SURROY CHOWDURY D. Trichophyton rubrum infection resistant to griseofulvin. Bull. Calcutta Sch. Trop. Med. (1965) 12, 68.

(8) BARATHOVA H.,BETINA V.et NEMEC P. Morphological changes induced in fungi by antibiotics. Folia Microbiol. (1969) 14, 475.

(9) BARNES M. J.et BOOTHROYD B. The metabolism of griseofulvin in mammals. Biochem. J. (1961) 78, 41.

(10) BENT K.J.et MOORE R.H. The mode of action of griseofulvin. In Biochimical Studies of antimicrobial drugs. University press. Cambridge. (1966)

(11) BEHAL V. Investigation of the origin of O.Methyl Groups in griseofulvin using some ^{14}C Labelled Substrates. Fol. Microbiol. (1966) 11, 184.

(12) BIAL M. Deot. Med. woschchr. (1903) 29, 253 et 477.

(13) BLANK H.,TAPLIN D.et ROTH F.J. Electron microscopic observations of the effects of griseofulvin on dermatophytes. A.M.A. Arch. Dermatol. (1960) 81, 667.

(14) BOOTHROYD B., NAPIER E.J.et SOMERFIELD G.A. The demethylation of griseofulvin by fungi. (1961) Biochem. J. 80, 34.

(15) BOLOTIN M., COEN D., DEUTSCH J., DUJON B., NETTER P., PETROCHILO E.et SLONIMSKI P.P. La recombinaison des mitochondries chez Saccharomyces cerevisiae. Bull. Inst. Past. (1971) 69, 215.

(16) BURTON K. A study of the conditions and mecanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. Biochem. J. (1956) 62, 315.

(17) BRIAN P.W. Studies on the biological activity of griseofulvin. Ann. Bot. London (1949) 13, 59.

(18) BRIAN P.W. Griseofulvin. Trans.Brit.Myco.Soc.(1960) 43, 1.

(19) BRIAN P.W., CURTIS P.J.et HEMMING H.G. A substance causing abnormal development of fungal hyphae produced by P. Janczewskii ZAL.I Biological assay production , and isolation of "curling factor". Trans.Brit.Myco.Soc. (1946) 29, 173.

(20) BRIAN P.W., CURTIS P.J.et HEMMING H.G. A substance causing abnormal development of fungal hyphae produced by P. Janczewskii ZAL.III.Identy of "curling factor" with griseofulvin. Trans.Brit.Myco.Soc. (1949) 32, 20.

(21) BRIAN P.W., CURTIS P.J.et HEMMING H.G. Production of griseofulvin by Penicillium raistrickii P. Trans. Brit.Myco.Soc. (1955) 38, 305.

(22) CRACKOWER S.H.B. The effects of griseofulvin in mitosis in Aspergillus nidulans. Can. J. Microbiol. (1972) 18, 683.

(23) CREASEY W.A., BENSCH K.G.et MALAWISTA S.E. Colchicine, vinblastine and griseofulvin. Pharmacological studies with human leukocytes. Biochem. Pharmacol. (1971) 20, 1579.

(24) de BEER P.et PRUNIERAS M. La croissance de Microsporum gypseum en présence de griséofulvine.Etude mycologique. Bull.Soc.Fr.Derma.Syph. (1963) 70, 39.

(25) de FONBRUNE P. Technique de micromanipulation. ed. Masson Paris. (1949)

(26) DESVIGNES A., NGUYEN VAN H., VIDON D.et DARBORD J. Analyse génétique chez un champignon dermatophyte Arthroderma simii. (Note préliminaire) Ann. Inst. Pasteur (1972) 122, 943.

(27) DEYSSON G. Brève communication. Ann.Pharm.Franç. (1963) 21, 798.

(28) DEYSSON G.Sur les propriétés antimitotiques de la griséofulvine. Ann.Pharm.Franç. (1964) 22, 17.

(29) DEYSSON G. Influence de la griséofulvine sur les propriétés antimitotiques de la colchicine. Ann.Pharm. Franç. (1964) 22, 89.

(30) DISHE Z. Uber einige neue characteristiche farbereaktionen der thymonuklein seure und eine mikromethode zur bestimmung derschlen in tierschen organen mit hilfe dieser reaktionen. Mikrochemie (1930) 8, 4.

(31) EFIMOVA G.V.et MARKOVICH V. Spectrophotometric determination of griseofulvin in mycelium. Antibiotiki (1964) 9, 592.

(32) EL NAKEEB M.A.et LAMPEN J.O. Formation of complexes of griseofulvin and nucleic acides of fungi and its relations to griseofulvin sensitivity. Biochem. J. (1964) 92, 59.

(33) EL NAKEEB M.A.et LAMPEN J.O. Binding of tritiated griseofulvin by ribosome and RNA of Microsporum gypseum. Bacteriol. Proc. (1964) p.60.

(34) EL NAKEEB M.A.et LAMPEN J.O. Uptake of griseofulvin ^{3}H by the sensitive dermatophyte Microsporum gypseum. J. Bact. (1965) 89, 564.

(35) EL NAKEEB M.A.et LAMPEN J.O. Distribution of griseofulvin taken up by Microsporum gypseum. Complexes of the antibiotics with cell.constituants. J. Bact. (1965) 89, 1075.

(36) EL NAKEEB M.A.et LAMPEN J.O. Uptake of ^{3}H griseofulvin by microorganisms and its correlation with sensitivy to griseofulvin. J.Gen.Microbiol. (1965) 39, 285.

(37) EL NAKEEB M.A.,Mc LELLAN W.L.et LAMPEN J.O. Antibiotic action of griseofulvin on dermatophytes. J. Bact. (1965) 89, 557.

(38) ERBAKAN N.et LUTFULLAH A. A study of the development of resistance in vitro to griseofulvin by dermatophytes in Turkey. Acta.Med.Turc (1967) 3, 99.

(39) EVANS G.et WHITE N.H. Effects of the antibiotics radicicolin and griseofulvin on the fine structure of fungi. J. Exp. bot. (1967) 18, 465.

(40) EVELEIGH D.H.et KNIGHT S.G. The effect of griseofulvin on the cell wall composition of Trichophyton mentagrophytes. Bacteriol. Proc. (1965) G 82, 27.

(41) FINCHAM J.R.S.et DAY P.R. Fungal genetics. 3°edition Blackwell Scientific Publications (1971).

(42) GENTLES J.C. Experimental ringworm in guinea pigs:oral treatment with griseofulvin. Nature (1958) 182, 476.

(43) GOLDMAN L. Griseofulvin. Med.Clin.N.Am. (1970) 54, 1339.

(44) GRIN E.I., NADAZDIN M.et OZEGOVIC L. Investigations on the adaptivity of dermatophytes to griseofulvin. Mycopath.Myc.applic. (1966) 30, 31.

(45) GRIN E.I., NADAZDIN M.et OZEGOVIC L. Investigations of dermatophytes sensitivity to griseofulvin. Acta. Dermato. Venereol. (1965) 45, 283.

(46) GROVE J.F. Griseofulvin. Quart. rev. (1963) 17, 1.

(47) GROVE J.F., MACMILLAN J., MULHOLLAND T.P.C.et ROGERS M.A.T. Griseofulvin.IV Structure. J. Chem. Soc. (1952) 39, 77.

(48) HEJTMANEK M. et HEJTMANEKOVA-UHROVA Vegetative nuclei and differentiation of chromosomes in Trichophyton Vanheusegheii. Fol.Microbiol. (1968) 13, 410.

(49) HEJTMANEK M.et LENHART K. Genetic complementation of virulence in avirulent mutants of Microsporum gypseum. Fol. Biol. (1972) 18, 225.

(50) HUBER F.M. Griseofulvin. Dans Antibiotics I. Mechanism of action. Spriger Verlag (1967)

(51) HUBER F.M.et GOTTLIEB D. The mecanism of action of griseofulvin. Can.J. Microbiol. (1968) 14, 111.

(52) JADASSOHN W., LOZERON H., BRUN R., GAUDIN P., MAGGIORA A. et VIDMAR B. Of griseofulvin. Dermatol.(1968) 135,35.

(53) KUZ'MINA L.G.et ERON'KO P. Sensitivity of dermatophyte cultures isolated from patients treated with griseofulvin to that antibiotic.IV° scientific conference of the Leningrad Research of Antibiotics (1965)

(54) KWON-CHUNG K.J. Genetic study on the incompatibility system in Arthroderma simii. Sabouraudia (1972)10,74.

(55) LAMPEN J.O. Amphotericin B and other polyenic antifungal antibiotics. Am. J. Clin. Pathol. (1969) 52, 138.

(56) LARSEN W.G.et DEMIS D.J. Metabolic studies of the effect of griseofulvin and candicidin on fungi. J. Invest. Dermatol. (1963) 41, 335.

(57) LAUBIE H. Identification de la griséofulvine. Bull.Soc. Pharma. Bordeaux (1960) 99, 4.

(58) LENHART K. Killing and mutagenic effects of UV radiation on spores of Trichophyton terrestre. Z.Allg.Mikrobiol. (1965) 5, 222.

(59) LENHART K. Spontaneous mutants of Microsporum gypseum resistant to griseofulvin. Mycopath.Mycol.applic. (1968) 36, 150.

(60) LENHART K. Griseofulvin resistance in dermatophytes. Experientia (Basel) (1970) 26, 109.

(61) LENHART K.et LENHARTOVA Studies on the adaptation of dermatophytes to griseofulvin. Mykosen (1970) 13,303.

(62) Mc NALL E.G. Biochimical studies on the metabolism of griseofulvin. A.M.A. Arch. Dermatol. (1960) 81,657.

(63) Mc NALL E.G. Metabolic studies on griseofulvin and its mechanism of action. Antibiot. Ann. (1959/1960) 674.

(64) MALAWISTA S.E., SATO H.,BENSH K.G. Vinblastine and griseofulvin reversibility disrup the living mitotic splindle. Science (1968) 160, 770.

(65) MOULE Y. Etude des acides nucléiques et de certains dérivés organiques et inorganiques du phosphore dans les tissus animaux. Arch.Sci.Physiol. (1953) 7, 161.

(66) NAPIER E.J., TURNER D.I.et RHODES A. The in vitro action of griseofulvin against pathogenic fungi of plants. Ann. Bot. (London) (1956) 20, 461.

(67) NGUYEN VAN H. Etude des rythmes internes de croissance chez le Podospora anserina. Ann.Sci.nat.Bot.(1967) 9, 257.

(68) NICKERSON W.J. Molecular basis of form in yeast. Bacteriol. Rev. (1963) 27, 305.

(69) NORBERG B.O. Cytoplasmic microtubules and radial segmented nuclei (Rieder Cells).Effects of osmolarity, ionic strenght,pH penetrating non electrolytes, griseofulvin and a podophylline derivative. Scand. J. Haematol. (1971) 7, 349.

(70) OXFORD A.E., RAISTRICK H.et SIMONART P. Studies on the biochemistry of microorganisms.60.Griseofulvin $C_{17}H_{17}O_6Cl$,a metabolic product of Penicillium griseofulvum DIECK. Biochem. J. (1939) 33, 240.

(71) PAGET G.E.et ALCOCK S.J. Griseofulvin and colchicine: lack of carcinogenic action. Nature (1960) 188, 867.

(72) PAGET G.E.et WALPOLE A.L. Some cytological effects of griseofulvin. Nature (1958) 182, 1320.

(73) PAGET G.E.et WALPOLE A.L. The experimental toxicology of griseofulvin. Arch. Dermatol. (1960) 81, 750.

(74) PINETTI P.et BIGGIO L. Sulla sensibilita in vitro alla griseofulvina dei dermatomicetti e sulle condizioni ottimali che deveno essere realizzate per la sua determinazione. Rass.Med.Sarda.LXIV (1959) 6, 679.

(75) PLEMPEL M.et BARTMANN K. Experimental studies on the antimycotic action of clotrimazole in vitro and after local application in vivo. Drugs made in Germany (1972) 15, 103.

(76) POCK-STEEN B. Persistant mycosis for the nails caused by Trichophyton violaceum. Acta.Dermato.Venereol. (1967) 47, 934.

(77) PRAKAPCHUK A.et SMOL'SKI P.F. Electron microscopic study of Trichophyton of the gypseum grup. Akad Navuk Byelaruskai SSR Syeryya Biyalahichnykh (1965) 4, 70.

(78) PRUNIERAS M.et de BEER P. La croissance de Microsporum gypseum en présence de griséofulvine.1.Etude micro-cinématographique. Bull.Soc.Fr.Derma.Syph. (1962) 69, 197.

(79) PREVOST G. Etude génétique d'un basidiomycète:Coprinus radiatus Fr.ex.Bolt. Ann.Sc.nat.Bot. (1962) 3,425.

(80) REZABEK K. Determination of griseofulvin activity. Arch.Inst.Pasteur Tunis (1965) 42, 23.

(81) RHODES A., BOOTHROYD B., Mc GONAGLE M.P.et SOMERFIELD G.A. Biosynthesis of griseofulvin:the methylated benzo-phenone intermediates. Biochem. J. (1961) 81, 28.

(82) ROBINSON R.C.V., FERCIOT T.N.et ROBINSON H.R.M.R. In vitro resistance studies with griseofulvin. Arch. Derm. (1960) 81, 681.

(83) ROSENTHAL S.et WISE R.S. Studies concerning the development of resistance to griseofulvin in vitro. Arch.Derm. (1960) 81, 684.

(84) ROTH F.J. Griseofulvin. Ann.N.Y.Acad.Sci. (1960) 89, 750.

(85) ROTH F.J., SALIMAN B.et BLANK H. In vitro studies of the antifungal antibiotic griseofulvin. J.Invest Dermatol. (1959) 33, 403.

(86) SANDHU R.S.et RANDHAWA H.S. Action of griseofulvin on geophylic dermatophytes and related keratinophilic fungi. Mycopath. (1964) 22, 141.

(87) SCHNEIDER W.C. Phosphorous compound in animals tissues. I.Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. J. Biol.Chem. (1945) 161, 293.

(88) SEBASTIEN F. Recherches sur le mécanisme de l'action antibactérienne de la bacitracine. Thèse de doctorat d'état en pharmacie.Paris (1970) .

(89) SERRE M.et SIMON L. Action thérapeutique inattendue en rhumatologie d'un antibiotique antifongique:la griséofulvine. Presse Med. (1962) 70, 2263.

(90) SLONIMSKI P.P., ACHER R., PERE G., SELS A.et SOMLO M. Eléments du système respiratoire et leur régulation: cytochromes et isocytochromes.Mécanisme de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes. Ed.C.N.R.S. (1965).

(91) STOCKDALE P.M., MACKENSIE D.W.R.et AUSTWICK P.K.G. Arthroderma simii sp.nov.,the perfect state of Trichophyton simii Pinoy(comb.nov.) Sabouraudia (1965) 4, 112.

(92) TAPPEINER J.et MALE O. On the problem of griseofulvin resistance of deep trichomycose caused by dermatophytes. Proc.of the International Dermatological Symposium (1966).

(93) THYAGARAJAN T.R.,SRIVASTAVA O.P.et VORA V.V. Some cytological observations on the effect of griseofulvin on dermatophytes. Naturwissenschaften (1963) 50, 524.

(94) VIDMAR-CUJETANOVIC B., GAUDIN P., LOZERON H., JADASSOHN W. Induced griseofulvin resistance of Achorion quinckeanum in vitro and in vivo. Experientia (1966) 22, 737.

(95) VIDON D. Recherche du déterminisme génétique de la virulence chez Arthroderma simii par l'étude de mutants induits. Thèse de doctorat d'état (1973) Paris.

(96) WEITZMAN I.et SILVA HUTNER M. Non keratinous agar media as substrates for the ascigerous state in certain members of gymnoascaceae pathogenic for man and animals. Sabouraudia (1967) 5, 335.

(97) WEITZMAN I., ALLDERDICE P.W., SILVA HUTNER M.et MILLER O.J. Meiosis in Arthroderma benhamiae. Sabouraudia (1968) 5, 232.

(98) WEITZMAN I., ALLDERDICE P.W.et SILVA HUTNER M. Chromosome numbers in species of Nannizia and Arthroderma. Mycol. (1970) 62, 89.

(99) WISSEMAN C.L., SMADEL J.E., HAHN F.E.et HOPPS E.H. Mode of action of chloramphenicol.I.Action of chloramphenicol on assimilation of ammonia and on synthesis of proteins and nucleic acids in Escherichia coli. J. Bacteriol. (1954) 67, 662.

(100) WRIGHT J.M.et GROVE J.F. The production of antibiotics in soil.V.Breakdown of griseofulvin in soil. Ann. appl.Bot. (1957) 45, 36.